

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



DEL GEN A LA PATOFISIOLOGÍA:
NUEVAS ENFERMEDADES ASOCIADAS AL
CATABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS

TESIS DOCTORAL

Alfonso Luis de Oyarzábal Sanz

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



DEL GEN A LA PATOFISIOLOGÍA: NUEVAS ENFERMEDADES ASOCIADAS AL CATABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS

Memoria presentada por el Licenciado en Bioquímica **Alfonso Luis de Oyarzábal Sanz** para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología bajo la dirección de

Directora de Tesis:

Dra. Pilar Rodríguez-Pombo

Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid. Ha sido posible gracias a una ayuda de posgrado de la Asociación Española para el Estudio de Metabolopatías Congénitas (AEPEMEC) - Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM).

A mis padres y mis hermanos,
por su incondicionalidad.

A mi ahijado Jorge,
por pedirme que le lea los cuentos de Sendak.

“Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.
[...]
Ten siempre a Ítaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Mas no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguantar a que Ítaca te enriquezca.”

C.P. Cavafis.

Ya hemos llegado. Y resulta extraño sentir que, después de tanto recorrido, suene una cadencia final, que ya se vea ítica. Que haya tanto de mí en este trabajo, hace aún más evidente que el viaje habría sido total y absolutamente imposible sin vuestro apoyo. A todos y cada uno de vosotros, gracias por acompañarme.

A la Dra. Magdalena Ugarte, gracias por su confianza. Gracias, Maleni, por creer en el proyecto y en mí para hacerlo. Como me dijiste hace ya 5 años en tu despacho, “es un trabajo precioso, y creo que tú eres la persona para hacerlo; y al final lo que importa somos las personas, así que a por ello”. Gracias por tu ánimo cada vez que he presentado mis resultados.

A la Dra. Pilar Rodríguez Pombo, gracias por su dirección. Pili, gracias por haberme sabido llevar tan bien, por haberme dejado formar parte de tu equipo, y por hacer que funcionase. Por entenderme y saber cómo sacar el máximo partido de mí, por saber ver cuándo era mejor dejarme crecer y plantear explicaciones imposibles y cuándo traerme de vuelta a la realidad, cuando tenerme en cuenta y cuándo no hacer ni casi a un correo enfadado a horas intempestivas. Gracias por no dejar cabos sueltos, por compartir la visión del trabajo que hacíamos. Por preocuparte por mí y potenciar mi desarrollo. De todo corazón, gracias.

A las Dras. Lourdes Ruiz-Desviat y Belén Pérez, gracias por su apoyo desde el principio, cuando entré como un estudiante más, despistado y para unos meses. Lourdes, gracias por tu sinceridad, por ir sin rodeos, por animar y dar perspectiva cuando desde otra posición no siempre se tiene. Belén, gracias por, como me dijiste en una comida, “preferir al Alfonso becario al que hay que recordarle que es un becario que al becario callado y cabizbajo”. Por enseñarme a rectificar. A la Dra. Richard, gracias por su cercanía. Eva, gracias por preguntar siempre, por extralimitar lo profesional, por las charlas en cultivos. A la Dra. Gámez Abascal, gracias por sus consejos y confidencias. Gracias, Alex, por tener siempre una sonrisa y ver un paso más allá. Por los cafés fuera del CBM.

A lo largo de este trayecto he tenido la gran suerte de coincidir o colaborar con muchos profesionales que indudablemente me han marcado y enriquecido, en lo personal y en lo profesional. Ha sido un privilegio contar con tanta gente, y que gente tan maravillosa contase conmigo.

Al personal del Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, gracias. Gracias por haberme acogido como si fuese mi casa desde las primeras veces que bajé a hacer ensayos de actividad. Gracias por hacer que me sienta totalmente como uno más cada vez que bajo, y que no conciba pasar por la facultad de Ciencias y no ir a saludar. En especial, querría agradecer al Dr. Pedro Ruiz Sala su ayuda con los ensayos de metabolómica. Gracias, Pedro, por enseñarme con infinita paciencia como preparar las muestras para el masas, y a replantear los experimentos tanto como fue necesario hasta que dimos con la clave. A la Dra. Begoña Merinero, por leerse con especial atención cada artículo que hemos escrito, por atender a mis preguntas y animarme siempre que estábamos a punto de sacar algo. A Rosa, Fátima y Ascen, gracias una y mil veces. Rosa, gracias por tu sinceridad y los micro-desahogos en lo que dura un cigarrillo. Fa, gracias por tu sonrisa y por ver siempre la otra cara de las cosas. Gracias a las dos por ayudarme tanto como he necesitado con cada PCR, datos de Masiva, secuencias y todo lo que se pusiese por delante. A Ascen, gracias por enseñarme todo lo que sé de cultivos, por tu carácter templado y sincero. Es un privilegio haber aprendido de vosotras tres. A Julia y Eva, gracias por toda la ayuda cada vez que la he necesitado, por vuestro optimismo cada vez que he entrado en la secretaría. A todo el resto de equipo (Celia, Marga, Isaac, Marina, Manu, Maje, Charo, Palo, Fernando, Gonzalo...) de verdad, gracias por todo.

Querría agradecer a la Dra. Belén Pérez Dueñas y al Dr. Darío Ortigoza-Escobar todo lo que he aprendido gracias a sus colaboraciones. Me han supuesto un gran crecimiento profesional y personal, y tomar de primera mano el impacto de nuestro trabajo.

A la Dra. María Sánchez-Aragó, por enseñarme con infinita paciencia a utilizar el Seahorse, a medir ATP, lactato y mil cosas más. Mil gracias, Mary, por todas las charlas dentro y fuera del CBM. Gracias, porque sin ti no habría sido posible este trabajo tal y como lo veo hoy.

To Dr. Rodeheffer, many thanks for letting me learn at his lab at Yale University. For showing me that this was what I wanted, the lights and shadows of research.

A la Dra. Carmela Calés, por animarme a mirar más allá, por su cercanía, por su empuje.

A todo el personal de servicios del CBM que me ha echado un cable cuando más lo he necesitado: a Berta, del Servicio de Citometría de Flujo, por ayudarme a ajustar los settings, a pasar las muestras del ciclo y con todo lo que he necesitado. Al Servicio de Microscopía Confocal, en especial a Vero, que con infinita paciencia me ayudó a utilizar los equipos y a procesar mis imágenes. Y al servicio de Microscopía Electrónica, en especial a Maite, por ayudarme a tomar y analizar todas las fotos que hicimos.

A mis compañeros del 220, los “nuevos”, que de nuevos no tenéis nada, Ana, Ainhoa, Irene, Álvaro, y todos los que sí sois un poco más nuevos (jánimo Laura!). Por aguantar mis manías y mis picos de estrés. A los que pasasteis por aquí, Virginia, Elena, Ana Jorge, Paula... A Paula, por enseñarme todo al principio, desde hacer un Western a bajar al almacén. A mi iraní preferida. Gracias, Nooshin por tus masajes, por tu optimismo, por tu carácter amable y positivo, por tus locuras.

A mis compañeras del 204, mis Lokis, GRACIAS. Gracias por esos años, por no iros nunca. Generasteis un estándar de calidad imposible de alcanzar otra vez. Hicisteis que venir a trabajar no fuese “venir a trabajar”, y sin embargo es una de las temporadas que más hemos trabajado. Gracias por todas las risas, por todas las confidencias, por los grandes momentos dentro y fuera del CBM, por dar sentido a todo. Patri gracias por tu paciencia, por tu empatía, por recordar que a veces vale más estar sereno que saltar. A Sandra, por tu carácter resuelto, por tu asertividad, por tus explosiones de risa. A Rocío y Raquel, mis Conchitas, por no iros nunca del laboratorio, por los mil momentos y los otros mil que nos quedan; gracias por vuestro carácter tan diferente y complementario. A Lorena, por tu sonrisa, por poder con todo y animar a hacer mil cosas, por demostrar que siempre se puede un poco más. A Celia, por las confidencias y compartir el momento, cuando no veíamos el final y cuando ya se veía. A Pablo, ¡Pablíño!, el mejor compañero que su pudiese haber pedido; gracias por tus risas, por las copas en Santiago, por ser tan β que en realidad eras el α . Tanto Lo Siento y no tenías nada que sentir. A Pachu.... gracias. Por aguantarme desde tu primera comida de Navidad, por las risas, por tus puñitos, por ver el camino, por decir tanto con una mirada. Por cuidarme tanto estos últimos meses.

A los que empezasteis conmigo el viaje: Mónica, Heidi, Lendínez, Cobaya y Frías. Gracias por todo este camino, por todo lo que hemos recorrido y cómo nos ha cambiado. Moni, por tu capacidad de adaptarte a la situación, por aceptar lo que hubiese y desde ahí, actuar. Heidi, gracias por tu optimismo, por ver la vida siempre desde la cara positiva. Cobi, por aguantar tanto, por tu racionalidad. Lendínez y Frías.... Gracias por seguir aquí, después de todo lo que ha llovido. Hace ya 11 años que nos conocimos en una clase de Citología, y aquí seguimos. Volved ya, que se os necesita.

A Pablo: gracias por compartir tantos momentos desde hace tanto tiempo. Por hacer tan diferentes estos meses de biblioteca. Por tu autenticidad, por ser tan genial.

A Sahagún, por todos los ratos de esparcimiento compartidos, por sus ideas, por sus momentos koala, por encajar en cualquier sitio, por hacer tan fácil reír a tu lado. Gracias por adelantado por los momentos que nos quedan.

A mis compañeros de natación, los Halegatos. Gracias por enseñar cada día la importancia de formar equipo, por la fuerza de un alegato compartido. Al antiguo grupo Compes, Omar, Ricardo y Nuno, que confiaron en mí y no fallan nunca, a Osu, Elian, Cuqui, Crisu, Ana Pena, Anita, Pasi, Saura, Cañamero, Koen, Leti, Luis Oisto, Lorenzo, Lázaro, Moha, Nines (la última folclórica de España), Tusi, Txipi, Torregrossa, Edwin, Alberto Tetas, y un eterno etcétera que llenaría otra Tesis. Gracias por crear un ambiente en el que acabar el día por todo lo alto, en el que no importase como iba el resto, siempre había hueco para sonreír y celebrar los éxitos. Formáis un equipo maravilloso. A Javi Ostolaza, por llevar razón y quedarse a mi lado para demostrármelo. A Paula y Terín, por animarme a pegar un cambio a mi vida cuando más falta me hizo.

Al grupo de Pozuelo, Belén, Vicky, Carlos, Ali y +1s (y a la F1 que no para de aumentar). Por entender el estrés y buscarle salida. Por quedar a ver las elecciones y generar planes en los que la mayor locura es bailar sentados. A los Zorromonstruos, por lo mismo pero con cerveza, copas y terrazas.

To Vidhi, for her charm, for knowing me that well from the very begining; I could never forget our meeting in Paris. To Aggeliki, for her hugs, for the emergency weekends. To Haruka, for her positivity. To all of you, for not letting time go by.

A Javi, Andrés y Juan; si alguna vez leyeseis esto, sabed que os agradezco mucho que hayáis sido compañeros de viaje durante periodos tan significativos de estos años. Me habéis hecho querer ser mejor y me habéis apoyado en momentos clave. Como dice Zahra, “he tendido el don, el poder y la gracia de aquellas vidas que un día toqué”. Gracias por haber sumado tanto.

De entre mis libros preferidos, hay una frase que me atrapó especialmente. Como decía Charlie en “The Perks of Being a Wallflower”, “And I think they knew. Not anything specific really. They just knew. And I think that’s all you can ever ask from a friend”.

A Alfonso. Gracias por Pessoa, por Abdelá Taia, por Ángel González, por Naco Umbert & la compaía, por Cavafis, por las noches en el Tren de Noche a Lisboa, por todos los cafés y todos los vinos. Por cuidar de mi yo humanista, por ser tan magnético. Por tu Grande Bellezza. Por no desaparecer.

A Mónica, Alejandra y Menchu. Gracias por todo, por ser tres pilares en mi vida, por no bajaros del barco nunca. Moni, gracias por todos los momentos que hemos compartido desde hace ya tantos años, cuando yo era un mico que te ayudaba en clase de karate. Por los tés de los lunes que pasaron a ser cafés de domingos, y cenas en ático o meriendas en el bajo. Por ser la persona que mejor escucha y aceptar cualquier decisión que tomase, por respetar mi libertad y quedarte a mi lado para recogerme cuando me cayese. Por tu sinceridad y tu abrazo. Lola, gracias por crecer conmigo, por estar cuando te gustaba estar y cuando no, por no querer perderte nada. Por estar en la mayoría de mis mejores recuerdos, por la química que compartimos, por no necesitar palabras para comunicar. A Menchu, por seducirme sin darte cuenta una noche en la que quizá ninguno de los dos debíamos estar ahí. Por tu inteligencia y tu sentido de humor. Por responder a mis dudas de la clínica de cada gen que me estudiaba y de cada palabra que leía. Por ser tan brillante, y estar a mi lado. Como decía la canción, “mientras desnudo el ruido de mi mente, saber que estáis ahí me hace más fuerte”. A las tres, gracias. Hacéis que todo sea mejor.

Gracias, por simplemente “saber”.

A mi familia. Gracias. Gracias. Gracias. A mis tíos, primos y nueva generación, por tantísimos buenos momentos. Por las comidas de los sábados, los veranos, por celebrar conmigo cada éxito. Por vuestra generosidad. Por vuestra presencia. Por vuestra indisolubilidad. A la Abuela, por recordar la importancia de la unidad, de apoyar a los tuyos. A la Yaya, por recordar que hay que echar una sonrisa a la vida.

No habría llegado a ninguna parte sin mis padres y mis hermanos. Gracias por absolutamente todo. A mis padres, por apoyarme aún cuando yo no hubiese creído en mi. Por su inteligencia, por los valores en que me han formado. Por darme esta educación en su sentido más amplio, que es el mejor regalo que me podrían haber hecho nunca, por inculcarme el valor del trabajo, por enseñarme a diferenciar lo importante de lo superfluo. A mis hermanos, por asumir que la familia está para lo bueno y para lo malo, y no concebir remar en direcciones distintas. A los cuatro, porque aunque sería imposible escribir en este espacio todo lo que os debo, hacéis sentir que no os debo nada.

A todos, y de todo corazón, gracias. Gracias por hacerme tal y como soy, en todas y cada una de mis facetas. Por completarme, por acompañarme a cualquier Ítaca que pueda imaginar, y por dejarme imaginar cualquier Ítaca. Por viajar conmigo. Gracias.

ÍNDICE



ABREVIATURAS	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1 Catabolismo de los aminoácidos ramificados	7
1.1 El catabolismo de los aminoácidos ramificados comienza con una transaminación seguida de una descarboxilación oxidativa	8
La transaminación de los BCAAs a BCKAs está catalizada por la enzima BCAT	
A la transaminación de los BCAAs le sigue una descarboxilación oxidativa de los BCKAs, catalizada por el complejo multienzimático BCKDH	
1.2 Regulación del catabolismo de los aminoácidos ramificados	13
La fosforilación de la subunidad E1 α lleva al complejo BCKDH a la forma inactiva	
La defosforilación de la subunidad E1 α devuelve al complejo BCKDH a su forma activa	
2 Los aminoácidos ramificados en la homeostasis celular	17
2.1 Los BCAAs y la función mitocondrial: de la generación de especies reactivas de oxígeno al metabolismo energético	19
Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y su metabolismo	
Respiración mitocondrial y síntesis de ATP	
Dinámica mitocondrial y regulación metabólica	
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1 Pacientes	31
1.1 Presentación clínica y bioquímica del paciente PP2Cm	31
1.2 Presentación clínica y bioquímica de los pacientes BCKDK	32
1.3 Presentación clínica y bioquímica del paciente BCATm	32
1.4 Otros pacientes incluidos en el estudio	33
2 Materiales	34
2.1 Muestras de fibroblastos de pacientes y controles	34
2.2 Vectores	35
2.3 Reactivos y otros materiales	36
2.4 Anticuerpos	39
2.5 Oligonucleótidos	40

3	Métodos	41
3.1	Aislamiento y trabajo con ácidos nucleicos	41
	Aislamiento de ácidos nucleicos en células	
	Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos	
	Amplificación de gDNA y cDNA	
	Purificación de productos de PCR	
	Mutagénesis dirigida	
	RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)	
	Secuenciación de Sanger y nomenclatura de mutaciones	
	Análisis de ausencia de variantes en población control	
3.2	Aislamiento y trabajo con proteínas	44
	Separación electroforética de proteínas en geles de SDS-PAGE y electrotransferencia a nitrocelulosa para inmunodetección	
	Detección de proteínas por inmunofluorescencia	
3.3	Expresión de transcritos mediante transfección	45
	Transfección para la expresión transitoria de un vector	
	Infección mediante lentivirus para la expresión estable de un vector	
3.4	Determinación de la actividad enzimática del complejo BCKDH	48
3.5	Análisis de metabolitos mediante el marcaje con isótopos estables por MS/MS	48
3.6	Técnicas de citometría de flujo	49
	Medida del anión superóxido: MitoSOX	
	Medida del potencial de membrana mitocondrial: TMRM	
	Evaluación de la progresión del ciclo celular: IP	
	Aislamiento de la población GFP positiva post-infección	
3.7	Evaluación del consumo de oxígeno a tiempo real mediante respirometría en placa	50
3.8	Medida de la concentración de ATP celular	51
3.9	Análisis de la ultraestructura mitocondrial por microscopía electrónica	51
3.10	Nuevas técnicas de análisis masivo del genoma	51
3.11	Soporte informático y análisis estadístico	52
	RESULTADOS	55
1	Selección y estratificación bioquímica de pacientes	59
2	Análisis genético: búsqueda y caracterización de eventos causantes de patología	61
2.1	Deficiencia en proteína fosfatasa PP2Cm	61
	Búsqueda de eventos genómicos: Array de SNPs	
	Identificación de mutaciones en el gen <i>PPM1K</i>	
	Validación del gen <i>PPM1K</i> como responsable de patología	

2.2 Pacientes con alteraciones de comportamiento tipo autista: deficiencia en la proteína BCKD quinasa	69
Firma metabólica compatible con hiperactividad de BCKDH	
Identificación de mutaciones en el gen <i>BCKDK</i>	
Validación del gen <i>BCKDK</i> como responsable de patología	
2.3 Deficiencia en proteína transaminasa BCATm	75
Identificación de variantes nucleotídicas por NGS	
Estudio de la patogenidad del cambio en <i>BCAT2</i>	
Expresión de los genes de BCKDH	
3 Identificación de las vías responsables de patogenia: impacto de la desregulación del metabolismo de BCAAs en la función mitocondrial	79
3.1 Desregulación del metabolismo de BCAA y función mitocondrial	79
Producción de anión superóxido y defensa antioxidante	
Respiración mitocondrial y síntesis de ATP	
3.2 Ausencia de fosfatasa PP2Cm: diferenciación entre el efecto de los metabolitos y de la proteína	83
Respiración mitocondrial y el papel de los BCAAs o BCKAs	
Sensibilidad al calcio y la formación de mPTP	
PP2Cm y muerte celular: activación de MAPK y genes de apoptosis	
3.3 Ausencia de quinasa BCKDK: respuesta de la mitocondria.	88
Función y dinámica mitocondrial en pacientes BCKDK	
Respuesta mitocondrial a la ausencia de BCKDK: modelos de interferencia	
Ausencia de BCKDK: destino celular.	
DISCUSIÓN	95
1 De la patología al gen: la importancia de la información	97
1.1 Estrategias para la identificación de nuevas mutaciones en patología molecular	97
1.2 Nuevas asociaciones de genes con patología: caracterización funcional de las mutaciones	99
2 Del gen a la patofisiología: búsqueda de rutas generales de patogenia	105
2.1 Anión superóxido, respiración mitocondrial y síntesis de ATP: el papel central de la mitocondria	105
2.2 Ausencia de proteína PP2Cm en humanos: ¿algo más que la desregulación de BCKDH?	108
2.3 Ausencia de proteína BCKDK en humanos: respuesta mitocondrial	110
CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	119
ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE LA TESIS	137



APS	Persulfato amónico
BCAA	Aminoácidos de cadena lateral ramificada
BCKA	Cetoácidos de cadena lateral ramificada
BDGP	Berkeley Drosophila Genome Project
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	Albúmina de suero bovino
Cpm	Cuentas por minuto
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	1,4,-ditio-L-treitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ácido etilen-diamino tetra-acético
ETC	Cadena Transportadora de Electrones
FADH	Flavin adenin dinucleótido
FBS	Suero fetal bovino
Glu	Glutamato
H2DCFDA	Dichlorodihydrofluorescein diacetate
HGMD	Human Gene Mutation Database
HPLC-MS/MS	Cromatografía Líquida de alta eficacia - Espectrometría de masas
IP	Ioduro de Propidio
kb	kilo bases
kDa	kilo daltons
LB	Luria-Bertani liquid medium
MAPK	Mitogen activated protein kinases
MEM	Medio Esencial Mínimo
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
MSUD	Enfermedad de la orina con olor a Jarabe de Arce
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NMD	Non-Mediated Decay
OXPHOS	Fosforilación Oxidativa
bp	Pares de bases
rcf	Fuerza Centrífuga Relativa
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SD	Desviación Estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetrametilendiamina
Tm	Temperatura de deshibridación
UPD	Disomía UniParental



Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) are key elements in cell metabolism and signaling. Their catabolism is mainly a mitochondrial process that starts with a transamination followed by an irreversible oxidative decarboxylation, catalyzed by the mitochondrial multienzymatic complex BCKDH. Defects on the early catabolism of BCAAs result in the neurological fatal rare disease Maple Syrup Urine Disease, providing a clear insight of the importance of their correct metabolism in health.

Throughout this work we have described a set of patients with novel diseases related to BCAA metabolism. The patients were referred to our lab due to their blood metabolites profile and clinical diagnosis. Based on such stratification, we sought the genetic cause underlying the pathology, relying on different technologies for genetic diagnosis.

In the first case reported we found the disease-causing mutation upon the description of a region of loss of heterozygosity that ranged the whole chromosome 4. These results pointed our attention towards *PPM1K* gene, coding for the phosphatase PP2Cm, thought to be the phosphatase positively regulating BCKDH complex activity. We confirmed an homozygous deletion of two base pairs on such gene, causing a frame shift that resulted in an upstream premature stop codon. Further analysis of the mutation effect confirmed the relationship of the loss of PP2Cm function with a decreased BCKDHc activity, responsible for the MSUD-like metabolic pattern found in the patient.

The diagnosis of a defect in BCKDHc-regulating kinase BCKDK in the second set of patients, characterized by an autistic-like behavior with growth and mental retardation and a decrease in BCAAs blood concentration, involved the establishment of such decrease as the metabolic signature for the disease, achieved through characterization of the metabolism rate of [U-¹³C]-Leucine in cultured fibroblasts. We found two loss-of-function mutations in *BCKDK*, c.520C>G and c.1166T>C, proved to be causing the described molecular phenotype. BCKDK is responsible for the phosphorylation and inactivation of BCKDH complex, so a defect in the kinase results in its constitutive activation.

As for the last patient, a Next Generation Sequencing study was performed, evaluating the coding exons of over 4.800 genes. Through the establishment of a few logic filters we found a mutation in *BCAT2*, coding for the mitochondrial transaminase responsible of the first step of BCAA metabolism.

On the search of actionable targets for disease treatment we pointed our research towards the study of the mitochondrial performance upon disruption in the BCAA metabolism regulation (both absence of PP2Cm and of BCKDK) for several reasons. We must recall that branched chain amino acids metabolism is a mitochondrial process itself. On top of that, PP2Cm had been described as a critical mitochondrial protein in animal models, and mitochondrial alterations have been described in the etiopathogenesis of some types of autism. We found an increase in O₂^{•-} production in both states, specially significant in the BCKDK patients' cells, in which the increase recorded was over two-fold. Appraisal of oxygen consumption rates revealed a decrease in the basal and ATP-linked respiration, that was indeed echoed in a great reduction of ATP cellular concentration.

On further analysis, we couldn't ratify the implication of PP2Cm in mPTP, as had been described in other models, but we did confirm an implication in cell survival sensitivity, as we registered an increase in MAPK activation and overexpression of certain pro-apoptotic genes. Therefore, it is still unclear what part of the phenotype described accounts for the BCAAs and what for PP2Cm deficiency itself.

Once analyzing the mitochondrial response to the hyper-catabolic state due to BCKDK deficiency, we registered more elongated and tubular mitochondria and increased fusion-related proteins Mfn2 and OPA1, results reproduced in BCKDK-interfered control fibroblasts. These results point towards diverse mitochondrial mechanisms to mitigate the damage caused by the decrease in amino acids, through the shape and function relationship, placing the mitochondria in a relevant position in the disease development.

Our results highlight the importance of the equilibrium in the BCAA metabolism regulation. The description of new genes involved in a metabolic route allows the definition or validation of a therapeutic approach to the disorder, and empowers the search of novel actionable pathways that address the different facets of the disease.

1 INTRODUCCIÓN

1 Catabolismo de los aminoácidos ramificados

El catabolismo de los aminoácidos ramificados comienza con una transaminación seguida de una descarboxilación oxidativa

La transaminación de los BCAAs a BCKAs está catalizada por la enzima BCAT

A la transaminación de los BCAAs le sigue una descarboxilación oxidativa de los BCKAs, catalizada por el complejo multienzimático BCKDH

Regulación del catabolismo de los aminoácidos ramificados

La fosforilación de la subunidad E1 α lleva al complejo BCKDH a la forma inactiva

La defosforilación de la subunidad E1 α devuelve al complejo BCKDH a su forma activa

2 Los aminoácidos ramificados en la homeostasis celular

Los BCAA y la función mitocondrial: de la generación de especies reactivas de oxígeno al metabolismo energético

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y su metabolismo

Respiración mitocondrial y síntesis de ATP

Dinámica mitocondrial y regulación metabólica



Como demostró en 1901 Sir Archibald Garrod al describir la alcaptonuria, los errores congénitos del metabolismo suponen variaciones en la homeostasis, es decir cambios en el mantenimiento de las condiciones que posibilitan la vida. De entre todas las reacciones que conforman el metabolismo, en este trabajo centramos la atención en el estudio del catabolismo de los aminoácidos de cadena lateral ramificada, y su implicación en salud y enfermedad.

En esta introducción abordaremos primero el catabolismo de los aminoácidos ramificados y su regulación, subrayando parte de los estados patológicos que surgen de sus alteraciones, para pasar a introducir la importancia de los aminoácidos ramificados en el mantenimiento de la homeostasis celular y mitocondrial.

1 | Catabolismo de los aminoácidos ramificados

Los tres aminoácidos ramificados (BCAAs), valina, leucina e isoleucina, son aminoácidos esenciales en mamíferos, que actúan no solo como unidades para la síntesis de proteínas, sino también como nutrientes señalizadores capaces de alterar el crecimiento o consumo de energía en distintos tejidos (Lynch and Adams 2014). Aunque la maquinaria enzimática para el metabolismo de los BCAAs es especialmente activa en hígado, su catabolismo también tiene lugar en otros tejidos, como músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo y neuronal. De hecho, proveen a la célula de precursores para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y ejercen como donadores de nitrógeno para la formación de glutamato (Hutson, Berkich et al. 1998, Hutson, Lieth et al. 2001), contribuyendo al mantenimiento de las reservas sinápticas de GABA y glutamato en diferentes áreas del cerebro (Cole, Sweatt et al. 2012). Siendo tan relevantes para el funcionamiento celular, el correcto catabolismo de los BCAAs resulta esencial para regular su propia homeostasis.

Si bien los tres BCAAs no se metabolizan a un único producto (siendo la valina glucogénica, la leucina cetogénica y la isoleucina glucogénica y cetogénica), comparten los dos primeros pasos de su catabolismo: una transaminación seguida de una descarboxilación oxidativa de su producto.

1.1 | El catabolismo de aminoácidos ramificados comienza con una transaminación seguida de una descarboxilación oxidativa

8

A grandes rasgos, tras la transaminación con la que empieza su catabolismo, valina, leucina e isoleucina forman los α -cetoácidos de cadena ramificada (BCKA) α -cetoisovalérico (α KIV), α -cetometilvalérico (α KMV) y α -cetoisocapróico (α KIC). Estos BCKAs son sustrato de una reacción de descarboxilación oxidativa común que genera derivados CoA, los cuales se convertirán en sus productos finales, acetoacetato, acetil-CoA y succinil-CoA, gracias a la acción ulterior de una serie de reacciones enzimáticas consecutivas.

A) La transaminación de los BCAAs a BCKAs está catalizada por la enzima BCAT

El primer paso del metabolismo es, como se ha indicado, una transaminación reversible, catalizada por la enzima Transaminasa de Aminoácidos Ramificados (BCAT, *Branched-Chain Aminoacid Transaminase*) (E.C.2.6.1.42). En el paso de BCAAs a BCKAs, la transaminasa catalizará la transaminación reversible de los aminoácidos ramificados al α -cetoglutarato (α KG), formando sus respectivos α -cetoácidos y glutamato (Ichihara and Koyama 1966), tal y como se muestra en la figura 1.

Existen dos isoformas de la enzima: una citosólica -BCATc- y otra mitocondrial -BCATm-, con expresión diferencial entre tejidos y tipos celulares (Hutson, Bledsoe et al. 1995, Bixel, Hutson et al. 1997). Estando codificadas por genes distintos (*BCAT1* para la forma citosólica y *BCAT2* para la mitocondrial), guardan un 85% de homología en su secuencia aminoacídica. El gen *BCAT1* (NM_005504.6) está compuesto por 9674 pb en 11 exones en el cromosoma 12, codificando para una proteína de 386 aminoácidos; por su parte, el gen *BCAT2* (NM_001284325.1) se encuentra localizado en el cromosoma 19, y codifica para una proteína de 392 aminoácidos. Atendiendo a su expresión diferencial, observamos que mientras que la forma mitocondrial está expresada en casi todos los tejidos, y juega un papel importante en la síntesis de glutamina y alanina en músculo esquelético (Suryawan, Hawes et al. 1998), la forma citosólica se encuentra predominantemente en tejido nervioso (García-Espinosa, Wallin et al. 2007).

BCAT es responsable, en condiciones fisiológicas normales, de la reposición de glutamato en neuronas mediante la transaminación de los BCAAs (Yudkoff, Nissim et al. 1983, LaNoue, Berkich et al. 2001), siendo ambas isoformas, y precisamente su expresión diferencial, las responsables de esta reposición (Hull, Hindy et al. 2012). Así, según lo validado en modelo de rata neonata, la transaminación de los BCAAs con el α KG en astrocitos mediante la forma BCATm, de expresión principal en este tipo celular (Cole, Sweatt et al. 2012), repondría el glutamato que hubiese escapado al ciclo de glutamato/glutamina, pasando el cetoácido correspondiente a la neurona, en la que la forma citosólica de BCAT catalizará la reacción inversa, generando α KG que entrará al ciclo de Krebs. La expresión y acción coordinada de todas las enzimas responsables de las primeras etapas del metabolismo de los BCAAs (BCATc, BCATm y BCKDH) entre las distintas células del tejido nervioso resulta por tanto esencial para el mantenimiento de la homeostasis de los BCAAs en dicho tejido, como se muestra en la figura 1.b.

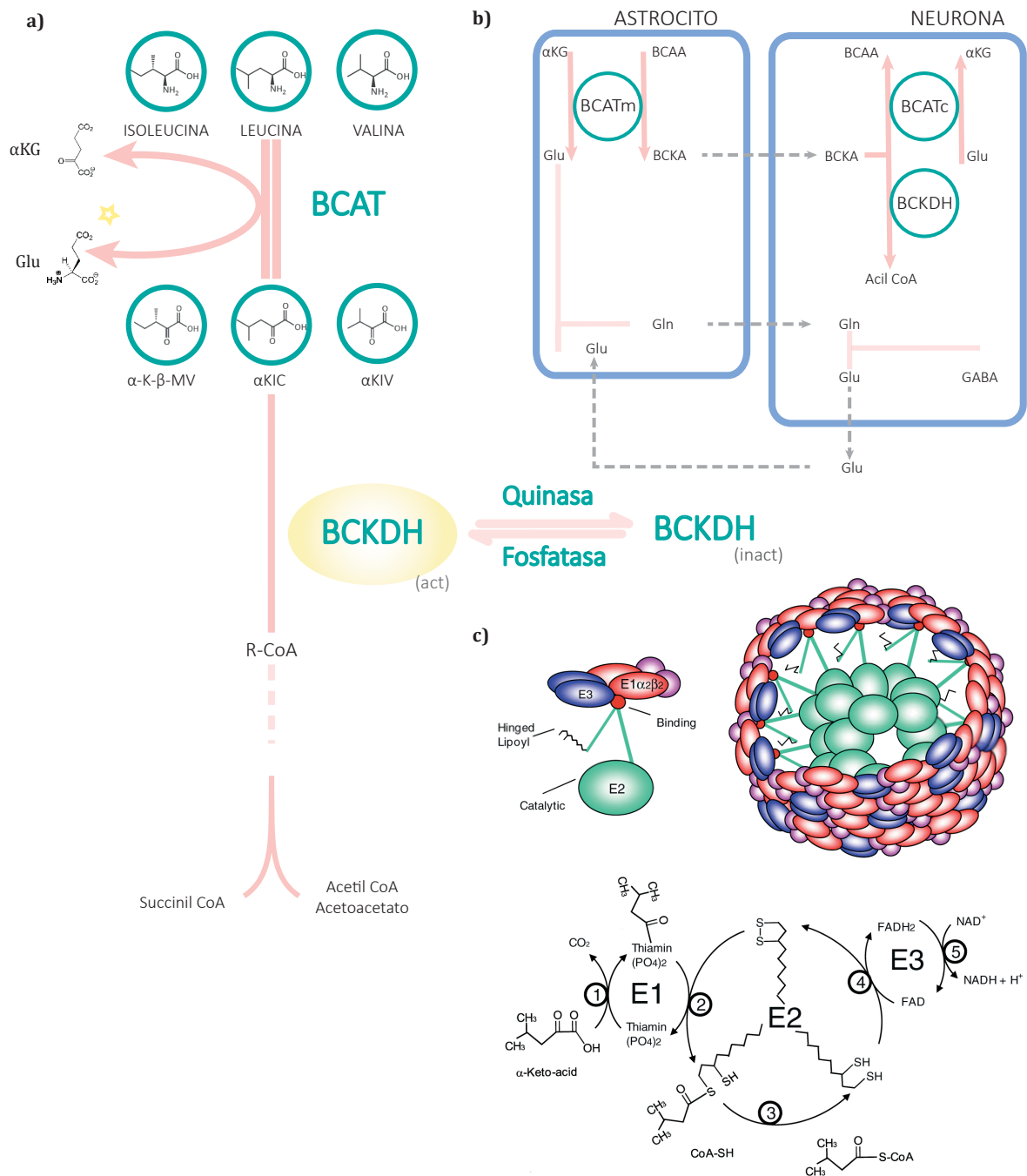


Figura 1_Principio del metabolismo de los BCAA: **a)** Los BCAAs se transaminan a sus respectivos BCKAs mediante la acción de la enzima transaminasa BCAT, a la vez que se produce la transferencia del grupo amino al α -cetoglutarato, formándose glutamato. Los BCKAs resultantes de esta reacción son sustrato de una reacción de descarboxilación catalizada por el complejo enzimático BCKDH, formándose los derivados CoA, que seguirán el metabolismo hasta succinil-CoA o acetil-CoA y acetotacetato. La principal regulación del catabolismo se realiza sobre el control por fosforilación y defosforilación del complejo BCKDH, ejercido por una proteína quinasa y otra fosfatasa. **b)** La transaminasa, y su expresión diferencial de las isoformas citosólica y mitocondrial, juegan un importante papel en el mantenimiento del ciclo de glutamato en sistema nervioso. Modelo comprobado en cerebro de rata neonata **c)** El complejo BCKDH está compuesto por las subunidades E1, E2 y E3, cuya acción coordinada permite la descarboxilación efectiva de los BCKAs

B) A la transaminación de los BCAAs le sigue una descarboxilación oxidativa de los BCKAs, catalizada por el complejo multienzimático BCKDH

10

La siguiente reacción en el catabolismo de los aminoácidos ramificados es una descarboxilación oxidativa irreversible de los α -cetoácidos a sus derivados CoA. Esta reacción está catalizada por el complejo multienzimático mitocondrial α -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa (BCKDH). Supone un paso crítico en el metabolismo de los BCAAs por ser la reacción limitante y punto de control del flujo catabólico de los aminoácidos ramificados.

El complejo BCKDH guarda alta similitud con los otros dos complejos deshidrogenasa mitocondriales, α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDH) y piruvato deshidrogenasa (PDH) (Reed and Hackert 1990, Reed 2001). Estos tres complejos 2-ceto ácido deshidrogenasa son iguales en estructura y mecanismo de acción. Están compuestos por tres subunidades catalíticas: la subunidad descarboxilasa E1 (un heterotetrámero E1 α E1 β), la subunidad dihidrolipoil transacetilasa (E2), sobre la que se ensambla el complejo, y la subunidad dihidrolipoil deshidrogenasa (E3), idéntica en los tres complejos. Catalizan la descarboxilación de los 2-cetoácidos para formar acil-CoA, NADH y CO₂ mediante reacciones acopladas. Actúan como maquinarias macromoleculares, en las que la asociación de subunidades no solo permite la co-localización de las enzimas, sino que acopla sus actividades, canalizando sustratos y productos (Kumaran, Patel et al. 2013). Cada uno de estos complejos ocupa una posición clave en el metabolismo intermediario, y su actividad está estrechamente regulada por hormonas y factores dietéticos, entre otros (Chuang and Shih 2001).

Tal y como se indica en la **Tabla 1**, cada una de estas subunidades del complejo BCKDH está codificada por distintos genes nucleares y precisa de un cofactor diferente para ejercer su actividad.

Tabla 1_Subunidades de BCKDH: Genes y cofactores

Subunidad	E.C.	Función	Cofactor	Gen	NM	Cromosoma
E1 α	E.C.1.2.4.4.	Descarboxilasa	Tiamina	<i>BCKDHA</i>	NM_000709.3	19q13.1-q13.2
E1 β	E.C.1.2.4.4.	Descarboxilasa	Tiamina	<i>BCKDHB</i>	NM_183050.2	6q13-q15
E2	E.C.2.3.1.168	Dihidrolipoil transacetilasa	Lipoico	<i>DBT</i>	NM_001918.2	1p31
E3	E.C.1.8.1.4	Dihidrolipoil deshidrogenasa	FAD	<i>DLD</i>	NM_000108.3	7q31-q32

Se ha descrito que el complejo multienzimático BCKDH forma un “supercomplejo molecular” o metabolón en asociación con la forma mitocondrial de la transaminasa, BCATm (Islam, Wallin et al. 2007). La enzima BCATm se une específica y exclusivamente a la subunidad E1, estimulando además su actividad descarboxilasa. Este ensamblaje supramolecular implica ventajas como la canalización de sustratos de las enzimas de una misma ruta metabólica, aumentando su eficiencia, además de aportar un sistema extra de control del flujo catabólico: el metabolón se desensambla en presencia

de NADH, producto de la descarboxilación, haciéndolo así sensible al estado redox celular. En estudios posteriores se comprobó que la enzima Glutamato Deshidrogenasa (GDH) también se unía a dicho metabolón (Islam, Nautiyal et al. 2010), ratificando así la importancia del metabolismo de los aminoácidos ramificados en el ciclo del glutamato.

Un bloqueo en la actividad del complejo BCKDH conduce a la acumulación neurotóxica de BCAAs y BCKAs en fluidos corporales, característica de la Enfermedad de Jarabe de Arce o MSUD (*Maple Syrup Urine Disease*) (OMIM #248600). Descrita por el Dr. Menkes en el año 1954 (Menkes, Hurst et al. 1954), es una enfermedad autosómica recesiva catalogada como rara (afecta a 1:185.000 nacidos vivos) que cursa con una clínica y bioquímica muy heterogénea, ya que se puede presentar desde formas variantes menos graves a las más comunes formas clásicas, con una mayor acumulación de metabolitos y presentación clínica más severa (Burrage, Nagamani et al. 2014). Estas formas clásicas más graves frecuentemente debutan en los primeros días con problemas de alimentación, letargia, descompensaciones metabólicas y síntomas de afectación neurológica que derivan en una encefalopatía severa (Strauss, Puffenberger et al. 1993), con convulsiones y episodios de coma que terminan en la muerte del paciente si no es tratado a tiempo. Aunque la presentación de la enfermedad depende en gran medida de la actividad residual real del complejo BCKDH en los distintos tejidos del paciente, en la estratificación inicial tradicionalmente se han utilizado parámetros como la edad de aparición de los síntomas, los niveles de BCAAs y sus derivados en fluidos fisiológicos, la actividad residual medida en células en cultivo o la tolerancia a proteínas (Strauss, Puffenberger et al. 1993, Nellis, Kasinski et al. 2003); la inclusión de la determinación de BCAAs en muestras de sangre en papel de neonatos dentro de los programas de cribado neonatal ampliado está no solo mejorando la calidad de vida de los pacientes, sino modificando la historia natural de la enfermedad (Couce Pico, Castineiras Ramos et al. 2007). Hasta la fecha, la terapia para esta patología se ha basado en la restricción que no eliminación dietética de BCAAs (Couce, Ramos et al. 2015), y el trasplante hepático, que al incrementar la tasa total de actividad enzimática residual propicia la evolución hacia fenotipos menos graves de la enfermedad (Díaz, Camarena et al. 2014).

La enfermedad de Jarabe de Arce es una enfermedad neuro-metabólica: si bien el sistema nervioso no es el único afectado, existe un patente daño neuronal (Fernstrom 2005), tanto en pacientes MSUD como en los modelos animales estudiados (Skvorak 2009, Zinnanti, Lazovic et al. 2009), y para el que se ha propuesto un mecanismo dual de patogenia. El primero tiene que ver que un desbalance neurotransmisor: el desbalance en el ciclo de glutamato/glutamina por una alteración de la actividad de BCKDH (Cole, Sweatt et al. 2012) resulta en un posible daño excitotóxico mediado por glutamato (Muelly, Moore et al. 2013), y en suma a esto, se ha observado una depleción de dopamina y serotonina que podría explicarse como resultado de la competición entre distintos aminoácidos neutros por el sistema de transporte Lat1 en la barrera hemato-encefálica. El incremento en la concentración de leucina en el entorno de la barrera disminuirá el transporte de otros aminoácidos neutros como triptófano y tirosina al cerebro, que utilizan el mismo sistema de transporte, reduciendo con ello la producción de serotonina y dopamina (Pardridge and Choi 1986, Smith, Momma et al. 1987, Strauss, Wardley et al. 2010). El segundo mecanismo de patogenia sería una posible disfunción mitocondrial producto, entre otros factores, de la inhibición de las enzimas mitocondriales implicadas en la

respiración, bloqueo ejercido por los BCKAs acumulados ante la depleción de la actividad de BCKDH (Clark and Land 1974, Wajner, Burger et al. 2007). Se ha descrito que concentraciones elevadas de α KIC inhiben la respiración mitocondrial, posiblemente a nivel del complejo I de la cadena transportadora de electrones (Sgaravatti, Rosa et al. 2003), aunque aún se desconoce el mecanismo.

12 Hasta el momento se han reportado más de 220 mutaciones que reducen la actividad del complejo BCKDH, clasificables en diferentes subtipos genéticos según el gen mutado: tipo Ia (mutaciones en *BCKDHA*), Ib (*BCKDHB*) y II (con mutaciones en el gen *DBT*), como se recoge en distintos artículos (Rodríguez-Pombo, Navarrete et al. 2006, Quental, Gusmao et al. 2009, Yang, Han et al. 2012, Jaafar, Moleirinho et al. 2013, Gupta, Bijarnia-Mahay et al. 2015). Aunque propuestos, no se habían descrito hasta el comienzo de este trabajo los tipos moleculares IV y V, correspondientes a los defectos en las proteínas reguladoras fosfatasa y quinasa (Filadi, Greotti et al. 2015)

Se sabe que la expresión y actividad del complejo BCKDH varía entre los diferentes tejidos (Suryawan, Hawes et al. 1998, Brosnan and Brosnan 2006). Esta expresión diferencial pone de manifiesto la importancia de los BCAAs en diferentes aspectos de la fisiología (Sunny, Kalavalapalli et al. 2015, Giesbertz and Daniel 2016, Halama, Horsch et al. 2016). Además, se describen variaciones entre la actividad máxima y las registradas en condiciones fisiológicas (Suryawan, Hawes et al. 1998), señalando la importancia no solo de la expresión del complejo sino también de su regulación para el correcto catabolismo de los aminoácidos ramificados.

1.2 | Regulación del catabolismo de los aminoácidos ramificados

El complejo BCKDH está sujeto a varios tipos de regulación, tanto a corto y largo plazo sin intermediación de proteínas reguladoras (Harris, Joshi et al. 2004), como por modificación post-traducciona mediante fosforilación-defosforilación (Harris, Joshi et al. 2004, Shimomura, Honda et al. 2006). En este caso, el complejo se inactivaría por efecto de su fosforilación catalizada por una quinasa en situaciones de necesidad de conservación de los BCAAs (Shimomura, Nanaumi et al. 1990, Popov, Zhao et al. 1992), y se defosforilaría por acción de una proteína fosfatasa ante un exceso de BCAAs (Damuni and Reed 1987), permitiendo su metabolismo.

Como regulación a corto plazo, el complejo BCKDH sufre una inhibición por producto; concretamente, se demostró una disminución en la capacidad catalítica del complejo en presencia de NADH y los derivados CoA (Parker and Randle 1978), lo que limita la degradación de los aminoácidos ramificados ante un exceso de los productos resultantes de su descarboxilación. La regulación a largo plazo incluye la disminución en la expresión de las subunidades del complejo BCKDH en situaciones de restricción proteica (Zhao, Popov et al. 1994).

A) La fosforilación de la subunidad E1 α lleva al complejo BCKDH a su forma inactiva

El principal mecanismo molecular para la inactivación del complejo BCKDH implica la fosforilación del residuo serina 293 de la subunidad E1 α . Esta reacción está catalizada por la quinasa mitocondrial BCKDK, que, anclada a la subunidad E2 del complejo (Li, Wynn et al. 2004, Wynn, Kato et al. 2004), lo fosforila e inactiva, acelerando el flujo catabólico de los BCKAs. No es por tanto de extrañar que en este momento la actividad quinasa constituya una atractiva diana terapéutica para el tratamiento de los pacientes MSUD.

La importancia de la fosforilación del complejo BCKDH como medida para mantener los niveles de BCAAs y BCKAs necesarios para la homeostasis celular se demostró hace más de 30 años, al encontrar un aumento en la forma fosforilada de BCKDH hepático en ratas sometidas a una dieta con restricción proteica (Harper, Miller et al. 1984); no obstante, no se identificó la proteína responsable hasta 1995, año en el que se aisló, caracterizó y clonó su cDNA (Harris, Popov et al. 1995).

El gen *BCKDK* (NM_005881.3) está compuesto por 12 exones localizados en el cromosoma 16, que generan un transcrito de 2.128 pares de bases. La proteína resultante tiene 412 aminoácidos, y un peso molecular de 43 kDa., y junto con las quinasas de PDH constituye una familia de proteínas quinasa mitocondriales bien caracterizadas (Davie, Wynn et al. 1995, Wynn, Chuang et al. 2000,

Machius, Chuang et al. 2001) y con dominios estructurales reminiscentes de los encontrados en las proteína histidina quinasas (Machius, Chuang et al. 2001), implicadas en sistemas de transducción de señales de dos componentes.

14

Al igual que el complejo al que regula, la proteína BCKDK también muestra una expresión diferencial dependiendo del tejido celular (Popov, Zhao et al. 1995, Doering, Coursey et al. 1998, Suryawan, Hawes et al. 1998). Esta recuerda la importancia de la proteína BCKDK en el control de la actividad de BCKDH, y por ende, de todo el flujo catabólico de los BCAAs. La actividad y expresión de la quinasa también está sujeta a una regulación a corto y a largo plazo: sufre una inhibición directa a corto plazo por α KIC (Parker and Randle 1978), y una disminución en su expresión a largo plazo por la exposición a dietas hiper proteicas (Popov, Zhao et al. 1995), glucocorticoides (Huang and Chuang 1999) y clofibrato (Honda, Ono et al. 1991, Kobayashi, Shimomura et al. 2000). Por el contrario, experimenta un incremento en su expresión por factores como la hormona tiroidea (Kobayashi, Shimomura et al. 2000). La identificación del α KIC como inhibidor de BCKDK (Harris, Popov et al. 1995) ha propiciado el desarrollo de análogos del cetoácido que también funcionasen como inhibidores de la enzima, tales como el α -cloroisocapróico (Harris, Paxton et al. 1982), el fenilpiruvato (Paxton and Harris 1984) o el fenilbutirato (Brunetti-Pierri, Lanpher et al. 2011), incrementando por tanto la actividad residual deficiente en pacientes con MSUD. En este momento se ensayan análogos estructurales más específicos (Tso, Qi et al. 2013).

En 2006 se describió un ratón deficiente para BCKDK (Joshi, Jeoung et al. 2006), en el que, asociado a la hiperactividad del complejo, se observaban disminuciones en los niveles de BCAAs en distintos tejidos y un fenotipo que incluía retraso en el crecimiento y anomalías neurológicas, tales como estereotipias o crisis epilépticas.

El fenotipo que encontramos en estos ratones *Bckdk*^{-/-} se asemeja a la sintomatología clínica que mostraban los pacientes que en 2012 describió el grupo del Dr. Gleeson (Novarino, El-Fishawy et al. 2012). Partiendo de una cohorte de pacientes con una forma de autismo co-mórbida con epilepsia, localizaron primero regiones de homocigosidad comunes para posteriormente, y mediante secuenciación de exomas de genes candidatos, encontrar mutaciones con un patrón de herencia recesiva en el gen *BCKDK*. Asociada a la pérdida de función de BCKDK, observaron un decremento en la fosforilación de BCKDHA, esto es, una pérdida de regulación negativa del complejo. Se describieron así los primeros pacientes con mutaciones en el gen *BCKDK*, poniendo de relieve la importancia de la homeostasis de los aminoácidos ramificados, tanto en acumulación como en deficiencia, para la salud y enfermedad.

B) La defosforilación de la subunidad E1 α devuelve al complejo BCKDH a su forma activa

Tras la inactivación del complejo BCKDH por la fosforilación de la serina 293 de su subunidad E1 α , la actividad es recuperada por la defosforilación de dicho residuo mediante la actividad de una fosfatasa

específica (Chuang, Chuang et al. 2006). En la actualidad se sabe que la fosfatasa responsable en humanos de la defosforilación y reactivación del complejo BCKDH es la enzima PP2Cm (Joshi, Jeoung et al. 2007, Lu, Sun et al. 2009, Wynn, Li et al. 2012, Oyarzabal, Martinez-Pardo et al. 2013). Se trata de una proteína fosfatasa de localización exclusivamente mitocondrial, que forma parte de la familia de las proteína-fosfatasas PP2, que incluye a las isoformas PDP1 y PDP2, ambas fosfatasas reguladoras del complejo PDH; se diferencia de estas, además de en la especificidad del sustrato, en su fuerte dependencia de Mn^{2+} en vez de Mg^{2+} , entre otros aspectos (Lu and Wang 2008).

15

Esta proteína fosfatasa está codificada por el gen *PPM1K* (NM_152542.4), que, localizado en la región cromosómica 4q22.1, consta de 7 exones que codifican para un transcrito de 1.941 pb, y se traducirá en una proteína de 372 aminoácidos, con un peso molecular de 40,9 kDa. Se ha descrito en ratón una presencia preferencial de la proteína en cerebro, corazón, hígado, riñón y diafragma, y muy reducida en músculo esquelético (Zhou, Lu et al. 2012).

En estudios sobre modelos murinos se propuso que PP2Cm actuaba sobre la subunidad E1 α del complejo BCKDH mediante el anclaje a la subunidad E2 (Lu, Sun et al. 2009), igual que la quinasa y compitiendo con esta (Zhou, Lu et al. 2012). Se postuló que la expresión y anclaje de ambas proteínas estaría orquestada por los niveles de BCAAs: ante una situación de aumento en las concentraciones de BCKAs, aumentaría la expresión y anclaje de PP2Cm, en detrimento de la quinasa, cuya actividad además se vería inhibida por la unión del α -cetoácido. Este mecanismo pone en relieve la importancia de la regulación del complejo BCKDH en el control del flujo catabólico de los BCAAs.

Previo a la identificación de PP2Cm como reguladora positiva del complejo BCKDH, la inactivación de PP2Cm en cardiomiocitos de ratón, células HeLa o en pez cebra permitió describirla como una fosfatasa de localización exclusivamente mitocondrial y con papeles esenciales para la supervivencia celular, el desarrollo embrionario y la función cardíaca. Implicada en la activación de cascadas de señalización de estrés, su inactivación incrementaba la susceptibilidad de cardiomiocitos en cultivo a una apertura prematura del poro de transición mitocondrial en respuesta a calcio, proponiéndose por tanto para la proteína un papel como reguladora del mismo (Lu, Ren et al. 2007).

Hasta la fecha de comienzo de este trabajo, no se había descrito ningún paciente con defectos en PP2Cm que permitiera claramente demostrar su implicación en la regulación del complejo en humanos, aunque, y por similitud con lo observado en PDH (Maj, MacKay et al. 2005), se postulaba para este tipo de pacientes un fenotipo de variante menos grave de MSUD.



2 | Los aminoácidos ramificados en la homeostasis celular

17

Como se indicó al principio de esta sección, los aminoácidos ramificados, más allá de ejercer como bloques para la síntesis de nuevas proteínas, controlan la síntesis y recambio de las mismas, tienen papeles fundamentales en la señalización celular, y ejercen un papel de creciente relevancia en el metabolismo energético y de la glucosa. A parte de la relación causa-efecto entre los aminoácidos ramificados y la enfermedad de Jarabe de Arce, se ha demostrado una aparente correlación entre los niveles de BCAAs y enfermedades del metabolismo como la diabetes (Giesbertz and Daniel 2016) o la obesidad (She, Olson et al. 2013, Halama, Horsch et al. 2016). En relación a esto, se han reportado efectos protectores de los BCAA contra la obesidad (Halama, Horsch et al. 2016), pero también son numerosos los estudios que sugieren la existencia de una relación positiva entre la resistencia a insulina y el incremento en los niveles de BCAA (Lynch and Adams 2014, Giesbertz and Daniel 2016), sin que se haya podido establecer claramente si los BCAAs son un factor causativo de resistencia a insulina o un mero biomarcador de su pérdida de actividad (Lu, Xie et al. 2013). Además, recientemente se ha descrito cómo el catabolismo de los BCAAs favorece la diferenciación de los adipocitos y la lipogénesis (Green, Wallace et al. 2016). En suma a todo esto, y como ya se ha visto en el título anterior, son piedras angulares de la función cerebral, generando su desbalance graves alteraciones neurológicas. En este capítulo centraremos la atención no sobre los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis de los BCAAs, si no en la importancia de los mismos en el mantenimiento de la homeostasis celular.

Durante mucho tiempo se ha considerado el metabolismo intermediario y la transducción de señales como entidades independientes; por una parte se estudiaban las reacciones necesarias para la obtención de energía, y por otra las cascadas de señalización que controlaban los procesos celulares (Green, Galluzzi et al., 2014). Hoy en día sabemos que ambas aproximaciones están relacionadas, manifestándose incluso al nivel de los orgánulos celulares implicados en las reacciones, como por ejemplo la mitocondria, clave para el metabolismo energético y con un papel central para la regulación de procesos como la supervivencia o muerte celular. En respuesta a cambios en la condición ambiental (como la disponibilidad de nutrientes u oxígeno, por ejemplo), las células deben adaptarse o morir. Para ejercer esa adaptación -o programar la muerte llegado el caso-, la célula cuenta con puntos de control metabólicos que determinan el destino celular ante las alteraciones (Green, Galluzzi et al., 2014). Estos puntos de control metabólicos podrían definirse como mecanismos moleculares que regulan la función celular en respuesta a fluctuaciones metabólicas, comprendiendo cuatro elementos: señales, sensores, transductores y efectores (Wang and Green 2012). Elementos como la disponibilidad de glucosa y aminoácidos, reducciones en la carga energética o redox y variaciones en las concentraciones de acetil-CoA citosólico se han postulado como señales metabólicas implicadas en la respuesta adaptativa de la célula.

Estas señales interactuarían con el sensor mTORC1, relacionado estrechamente con los aminoácidos (Jewell, Russell et al. 2013), y especialmente con la leucina (Lynch, Halle et al. 2003, Li, Yin et al. 2011, Dodd and Tee 2012). Se trata de un nodo de regulación que controla el crecimiento y proliferación celular y la autofagia mediante la activación por fosforilación de la proteína quinasa mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que se activa en la superficie del compartimento lisosomal, permitiendo a la célula responder ante determinadas señales como la disponibilidad de nutrientes (Jewell and Guan 2013). Activado por las distintas señales posibles, la fosforilación de mTORC1 comienza una cascada de señalización que regula, entre otros procesos, la función mitocondrial (Ramanathan and Schreiber 2009), observándose cómo la inhibición de mTOR cambia el metabolismo celular desde la mitocondria a la anaerobiosis, regulando el consumo de oxígeno y la capacidad oxidativa (Schieke, Phillips et al. 2006).

Se ha demostrado en líneas de adipocitos que el catabolismo de la leucina e isoleucina puede suponer un tercio del aporte de acetil-CoA lipogénico (Green, Wallace et al. 2016). Este desempeña funciones importantes no sólo como precursor lipogénico, sino también como donador del grupo acetilo para las reacciones de acetilación, que regulan la transcripción de diversos genes.

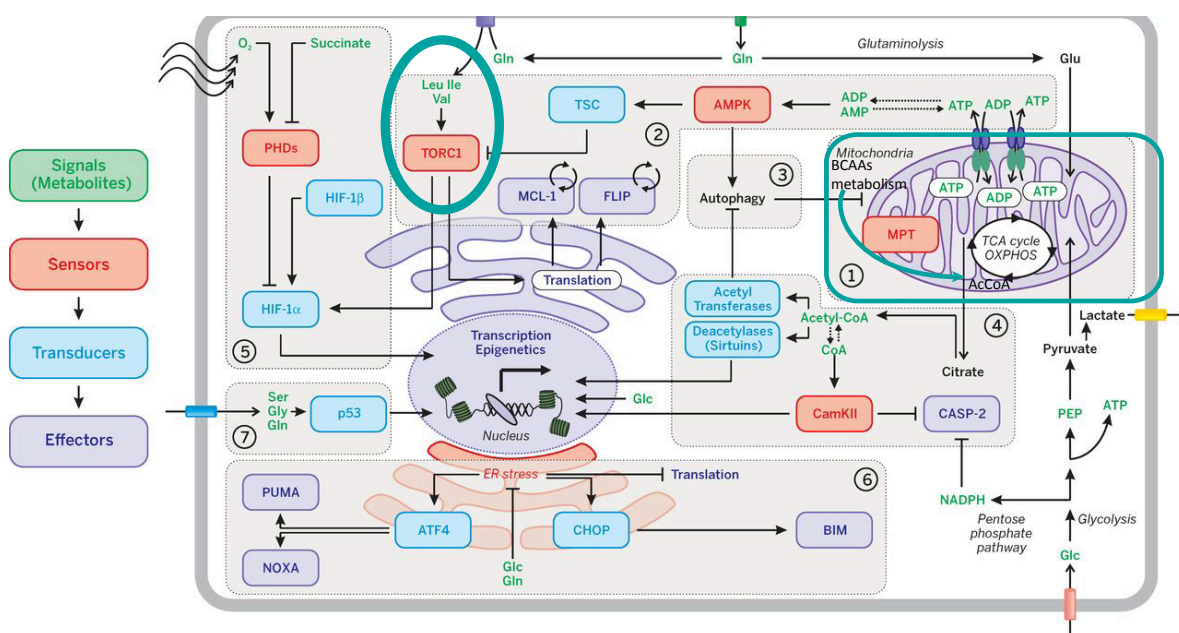


Figura 2. Señalización de muerte o supervivencia celular: Puntos de control metabólico, que procesan los cambios en el metabolismo (señales) detectadas por sistemas específicos (sensores), convirtiéndolas en estímulos vitales o letales que activarán procesos de la maquinaria de muerte celular (efectores) mediante diferentes nódulos de señalización (transductores). Se destaca la importancia de los BCAA como señal para la activación de mTORC1, así como la importancia de la función mitocondrial (en la que tiene lugar el metabolismo de los BCAA) y el Acetil-CoA en la supervivencia o muerte celular.

2.1| Los BCAA y la función mitocondrial: de la generación de especies reactivas de oxígeno al metabolismo energético

19

Las mitocondrias constituyen una red dinámica que realiza funciones interconectadas muy diversas, no solo generando ATP e intermediarios biosintéticos o catabolizando metabolitos como los BCAA, sino también contribuyendo de forma muy activa a la respuesta celular al estrés. Son, además, fuentes importantes de especies reactivas de oxígeno (ROS), que contribuyen a la señalización redox retrógrada desde el orgánulo al citosol y núcleo, pero también al daño oxidativo que subyace en muchas patologías, incluidas las enfermedades metabólicas. Por ello, no es sorprendente que la disfunción mitocondrial haya emergido como un tópico biomédico importante.

A) Las especies reactivas de oxígeno y su metabolismo

El término “especies reactivas de oxígeno” (ROS, *Reactive Oxygen Species*) se refiere a una variedad de moléculas reactivas derivadas del oxígeno que pueden ser radicales libres (como el anión superóxido O_2^- o el radical hidroxilo OH^\cdot) o no radicales (como el peróxido de hidrógeno H_2O_2), como se revisa en (Bolisetty and Jaimes 2013), y cuya formación es inherente a la propia función mitocondrial, formándose a bajas concentraciones como producto de los procesos fisiológicos normales de la mitocondria (Chance, Sies et al. 1979).

Tradicionalmente se ha pensado que el anión superóxido se genera como subproducto normal de la función de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, normalmente por transferencia de un electrón desde alguno de los grupos prostéticos de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico (ETC) (Murphy 2009). A concentraciones elevadas, las especies reactivas de oxígeno pueden ser tóxicas para la célula, pero en condiciones fisiológicas desempeñan un papel relevante como moléculas señalizadoras implicadas en la apoptosis (Kaminsky and Zhivotovsky 2014) y la proliferación (Owusu-Ansah, Yavari et al. 2008) y diferenciación celular (Weidinger and Kozlov 2015), entre otros. Por tanto, la generación de radicales libres está equilibrada con los sistemas de defensa antioxidante de la célula, y cuando se produce un desbalance entre ROS y defensa que no puede ser compensado, se genera un estado de estrés oxidativo que puede resultar en daño celular.

Como se resume en la **figura 3**, el anión superóxido generado dentro de la mitocondria es mayormente convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de la enzima MnSOD, perteneciente a la familia de metaloenzimas llamadas superóxido dismutasas (Fridovich 1995). El peróxido de hidrógeno resultante de la reacción no es una especie reactiva de oxígeno en sí misma, pero tiene capacidad de difundir a través de las membranas, y en presencia de metales de transición reducidos puede derivar

en radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Venditti, Di Stefano et al. 2013), lo que hace que su metabolismo sea importante para la correcta función celular. La mayoría del peróxido de hidrógeno es metabolizado por la proteína glutathion peroxidasa (GPX), que lo oxidará en agua.

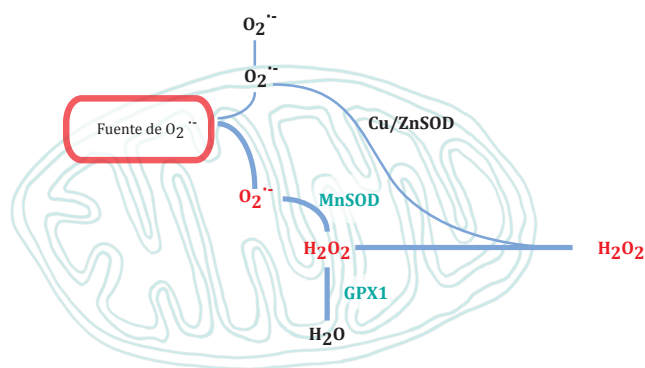


Figura 3_Esquema de las especies reactivas de oxígeno mitocondriales y su metabolismo: Por acción de diversas fuentes de generación, un electrón es transferido a una molécula de oxígeno, formándose anión superóxido $O_2^{\bullet-}$. Este es metabolizado por la enzima superóxido dismutasa (MnSOD), que lo transforma en peróxido de hidrógeno o H_2O_2 , sustrato de la enzima glutathion peroxidasa (GPX).

Si bien apuntábamos a que tradicionalmente se ha propuesto distintos puntos de la cadena transportadora de electrones como los principales centros de generación de ROS (McLennan and Degli Esposti 2000, Fato, Bergamini et al. 2008, Murphy 2009), recientemente se ha descrito a los complejos multienzimáticos deshidrogenasa mitocondriales como importantes productores de ROS en ciertas condiciones (Adam-Vizi 2005). Determinados estudios proponen que el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa es, de hecho, la fuente principal de generación de especies reactivas de oxígeno en una mitocondria con funcionamiento normal (Starkov, Fiskum et al. 2004). Concretamente, se postula que la subunidad DLD de las deshidrogenasas mitocondriales serán fuentes constitutivas de radicales libres en condiciones de una razón $NADH/NAD^+$ elevada (Bunik and Sievers 2002), o bajo situaciones de actividad enzimática incrementada (Adam-Vizi and Tretter 2013), en tasas muy superiores a las de, por ejemplo, el complejo I de la ETC (Quinlan, Goncalves et al. 2014). Se ha descrito que la flavina contenida en la subunidad E3 del complejo α KGDH, reducida en condiciones de elevado poder reductor, reducirá al oxígeno, formando anión superóxido (Tretter and Adam-Vizi 2005).

El incremento en las especies reactivas de oxígeno está implicado en la patofisiología de multitud de enfermedades, como el cáncer (Yang, Karakhanova et al. 2016), enfermedades cardiovasculares (He and Zuo 2015), neurodegenerativas (Borquez, Urrutia et al. 2016) y metabólicas (Rani, Deep et al. 2016). Se ha establecido una correlación entre la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo y las enfermedades de espectro autista (Guevara-Campos, Gonzalez-Guevara et al. 2013, Legido, Jethva et al. 2013, Rossignol and Frye 2014). Esto abre un campo de investigación y potencialidad de tratamiento para un grupo tan heterogéneo de enfermedades como es el autismo (Frye and Rossignol 2014).

También se ha descrito una participación importante la desregulación de las especies reactivas de oxígeno en las enfermedades mitocondriales (Kirkinezos and Moraes 2001), en las que los aumentos

en ROS pueden producir deficiencias de fosforilación oxidativa, y viceversa, lo que resulta en un estado patológico. En este marco, se ha puesto de relevancia la importancia del estrés oxidativo en los defectos congénitos del metabolismo (Mc Guire, Parikh et al. 2009), concretamente por el ROS generado por una disfunción de la cadena respiratoria, tanto por una disfunción mitocondrial directamente (Das 2003) como por acumulación tóxica de metabolitos (Brusque, Borba Rosa et al. 2002, Sgaravatti, Rosa et al. 2003). Un ejemplo de esto sería la acumulación neurotóxica de los BCAA y BCKA, observada en la patología de MSUD, que genera incrementos en la presencia de radicales libres de oxígeno (Bridi, Araldi et al. 2003, Funchal, Latini et al. 2006).

21

B) Respiración mitocondrial y síntesis de ATP

Tradicionalmente se ha descrito a la mitocondria como motor energético de la célula. Interviene en la última fase del catabolismo celular, albergando una serie de reacciones de oxidación que transforman el piruvato, ácidos grasos y aminoácidos en los equivalentes energéticos ATP, NADH y FADH_2 .

En la mitocondria se localiza la cadena transportadora de electrones (ETC, *Electron Transport Chain*), un conjunto de cuatro complejos multiprotéicos embebidos en la membrana mitocondrial y dos transportadores que los conectan. La oxidación de los sustratos energéticos NADH y FADH_2 libera electrones, que serán transferidos a lo largo de la cadena hasta el complejo citocromo oxidasa, que acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del O_2 a H_2O . A lo largo de este proceso de transporte de electrones, los diferentes complejos bombean protones al espacio intermembrana, estableciéndose un gradiente electroquímico entre este y la matriz mitocondrial. Este gradiente será utilizado por un quinto complejo, la H^+ -ATP sintasa, que acopla la entrada de esos protones a la matriz mitocondrial con la formación de ATP a partir de $\text{ADP} + \text{P}_i$.

Los aminoácidos ramificados pueden ejercer un papel importante en el metabolismo energético. Además de la relación establecida entre BCAA y la fisiología del metabolismo de la glucosa (Adeva, Calvino et al. 2012, Lu, Xie et al. 2013, Lynch and Adams 2014), se demostró hace ya más de 30 años que el αKIC inhibe las deshidrogenasas PDH y KGDH (Jackson and Singer 1983). Por otra parte, los α -cetoácidos que se acumulan en condiciones de MSUD inhiben el metabolismo energético cerebral (Sgaravatti, Rosa et al. 2003), de tal manera que, a elevadas concentraciones de BCKA, se favorece el metabolismo anaerobio, en detrimento de la fosforilación oxidativa. Estudios posteriores en tejido hepático de rata afinaron que los BCKA ejercían un efecto bifásico sobre la respiración mitocondrial (Shestopalov and Kristal 2007), estimulando la respiración a concentraciones fisiológicas, pero inhibiéndola a concentraciones elevadas.

Los BCAAs derivan mediante su catabolismo en acetil-CoA, cetonas o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Hutson, Sweatt et al. 2005, Brosnan and Brosnan 2006). Así, el catabolismo ineficiente de estos sustratos anapleróticos puede resultar en “estrés anaplerótico”, que termina en una actividad del ciclo de Krebs subóptima (Sunny, Kalavalapalli et al. 2015), afectando al estado

energético celular. Esto resalta la importancia de los BCAAs en el metabolismo energético a dos niveles diferentes: los propios aminoácidos y cetoácidos, como moléculas señalizadoras y sustratos respiratorios, y los productos finales de su catabolismo, como intermediarios de la respiración o moléculas de transporte de energía.

22 Deficiencias en el metabolismo energético de la célula pueden suponer deficiencias en la síntesis total de ATP, que pueden verse reflejadas en procesos fisiológicos celulares como el ciclo de división celular, y un reajuste de la morfología mitocondrial (Cogliati, Enriquez et al. 2016).

C) Dinámica mitocondrial y regulación metabólica

La morfología de la mitocondria está intrínsecamente unida a sus funciones, que incluye la producción de ATP por fosforilación oxidativa y el control de especies reactivas de oxígeno (Vafai and Mootha 2012). Así, en respuesta a distintos estados metabólicos, la dinámica mitocondrial hará que la forma de estas cambie según las necesidades de la célula. Para los procesos de fusión y fisión, que marcan el aspecto mitocondrial, el orgánulo dispone de una maquinaria molecular en las dos membranas: las mitofusinas, mitoPLD y Opa1 para la fusión de membranas, y Drp1 junto con Opa1 para la fisión (Wai and Langer 2016).

La dinámica mitocondrial está por tanto condicionada por factores como la disponibilidad de nutrientes y el metabolismo energético (Liesa and Shirihai 2013, Green, Galluzzi et al. 2014). Así, por ejemplo, la fusión mitocondrial podrá ser respuesta adaptativa a un nuevo estado en el medio en el que se requiera un aumento en la síntesis de ATP (Gomes, Di Benedetto et al. 2011). La fusión mitocondrial es un proceso muy conservado que, en mamíferos, requiere de la interacción orquestada de tres GTPasas de la superfamilia de las dinaminas: las proteínas de fusión mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) y Opa1. Dado que la mitocondria es un orgánulo con doble membrana, la fusión entre mitocondrias es un proceso de dos pasos, en los que la fusión de las membranas externas es seguida por la de las membranas internas. Las mitofusinas Mfn1 y Mfn2 orquestan la fusión de la membrana externa mitocondrial mediante una interacción dependiente de la hidrólisis de GTP (Wai, Garcia-Prieto et al. 2015), y son necesarias para el mantenimiento de la red mitocondrial reticular en las células. Además, la mitofusina 2 ha sido relacionada con funciones clave en el control del metabolismo energético y mitocondrial (Mourier, Motori et al. 2015, Zorzano, Hernandez-Alvarez et al. 2015). Por su parte, Opa1 existe en dos isoformas, una larga y una corta, siendo el papel de cada una controvertido. Mientras estudios concluyen que el procesamiento proteolítico de Opa1 es un evento pro-fusión y necesario para la misma (Frezza, Cipolat et al. 2006, Ishihara, Fujita et al. 2006), aumentando su procesamiento en situaciones de déficit de ATP (Baricault, Segui et al. 2007), otros relacionan su procesamiento proteolítico con la fragmentación mitocondrial (Wai, Garcia-Prieto et al. 2015). En todo caso, si que hay un consenso establecido en que, mediante el favorecimiento de las arquitecturas conectadas o fragmentadas, la dinámica mitocondrial permite a la célula regular su eficiencia y gasto bioenergético (Liesa and Shirihai 2013).

Mutaciones en los genes relacionados con la fusión mitocondrial producen diferentes patologías: se ha descrito la implicación de cambios en Mfn2 en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A, una neuropatía periférica que afecta a las neuronas motoras y sensitivas, y en Opa1 con atrofia óptica dominante, un tipo de ceguera causado por la degeneración de las células del ganglio de la retina.

En este trabajo, partiendo de la identificación bioquímica de pacientes con sospecha de patologías que afectaban a las primeras etapas del catabolismo de los aminoácidos ramificados, hemos descrito mutaciones en los genes que codifican para las proteínas reguladoras del complejo BCKDH y para la transaminasa mitocondrial. Además, hemos aprovechado la ventaja que supone disponer del modelo KO natural para profundizar en la patofisiología de las enfermedades descritas, explorando el efecto de la alteración en la regulación de los BCAAs sobre la demanda energética y la adaptación de la dinámica mitocondrial a los cambios identificados.

2 OBJETIVOS



El **objetivo principal** de esta Tesis ha sido profundizar en el conocimiento de la regulación del catabolismo de los aminoácidos ramificados y de los estados patológicos que pueden surgir del mismo, para desde ahí buscar nuevas dianas de acción terapéutica.

Con esto, se marcaron los siguientes **objetivos específicos**:

- 1 Selección y estratificación bioquímica de pacientes con nuevos defectos en el catabolismo de los aminoácidos ramificados.
- 2 Búsqueda y caracterización de los eventos causantes de patología en cada caso, mediante análisis genético y caracterización de mutaciones.
- 3 Identificación de vías responsables de patogenia, mediante el estudio del impacto de la desregulación del metabolismo de los BCAAs en la función mitocondrial.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

1 Pacientes

2 Materiales

- Muestras de fibroblastos de pacientes y controles
- Vectores
- Reactivos y otros materiales
- Anticuerpos
- Oligonucleótidos

3 Métodos

- Aislamiento y trabajo con ácidos nucleicos
 - Aislamiento de ácidos nucleicos en células
 - Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos
 - Amplificación de gDNA y cDNA
 - Purificación de productos de PCR
 - Mutagénesis dirigida
 - RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)
 - Secuenciación de Sanger y nomenclatura de mutaciones
 - Análisis de ausencia de variantes en población control
- Aislamiento y trabajo con proteínas
 - Separación electroforética de proteínas en geles de SDS-PAGE y electrotransferencia a nitrocelulosa para inmunodetección
 - Detección de proteínas por inmunofluorescencia
- Expresión de transcritos mediante transfección
 - Transfección para la expresión transitoria de un vector
 - Infección mediante lentivirus para la expresión estable de un vector
- Determinación de la actividad enzimática del complejo BCKDH
- Análisis de metabolitos mediante el marcaje con isótopos estables por MS/MS
- Técnicas de citometría de flujo
 - Medida del anión superóxido: MitoSOX
 - Medida del potencial de membrana mitocondrial: TMRM
 - Evaluación de la progresión del ciclo celular: IP
 - Aislamiento de la población GFP positiva post-infección
- Evaluación del consumo de oxígeno a tiempo real mediante respirometría en placa
- Medida de la concentración de ATP celular
- Análisis de la ultraestructura mitocondrial por microscopía electrónica
- Nuevas técnicas de análisis masivo del genoma
- Soporte informático y análisis estadístico



1 | Pacientes

31

Las muestras de pacientes son fibroblastos procedentes de biopsias de piel obtenidas con el consentimiento informado de los padres y por el hospital que remitió las muestras. Toda la investigación llevada a cabo con este material está autorizada por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respetando los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración universal de la UNESCO sobre el programa Genoma Humano y Derechos Humanos.

Los datos relativos a la caracterización bioquímica de los pacientes se realizó mediante la cuantificación por cromatografía de intercambio de iones o cromatografía de gases-masas en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares.

El presente trabajo está basado en las muestras de cuatro pacientes que fueron referidos al laboratorio con sospecha de una enfermedad metabólica hereditaria relacionada con el catabolismo de los aminoácidos ramificados. En base a los estudios que se desarrollan en el apartado de Resultados, se definió a los pacientes como PP2Cm, BCKDK_1 y BCKDK_2 y BCATm.

1.1 | Presentación clínica y bioquímica del paciente PP2Cm

El paciente presentado es una mujer nacida en 1990 y que fue diagnosticada como una forma suave de la enfermedad de Jarabe de Arce. El diagnóstico se realizó al detectar en el cribado neonatal ampliado niveles de BCAAs y BCKAs de dos a cuatro veces aumentados en plasma, con los valores que se muestran en la **tabla 11**. Por tanto, fue puesto inmediatamente bajo un tratamiento dietético con restricción de aminoácidos ramificados, tal y como se procede de manera habitual con los pacientes de Jarabe de Arce. La paciente nunca llegó a debutar clínicamente.

Aunque en las analíticas de seguimiento ha seguido mostrando unos niveles ligeramente aumentados respecto a los controles, hasta la fecha no ha mostrado ningún signo clínico de la enfermedad, ni debutado con ninguna crisis metabólica.

1.2| Presentación clínica y bioquímica de los pacientes BCKDK

32

El primero de los dos pacientes (P.BCKDK_1 en este trabajo) es un niño que fue referido al Hospital Sant Joan de Deu por un retraso psicomotor que apareció a partir del primer mes de vida, al que siguieron síntomas neurológicos durante el desarrollo, como incapacidad para andar y anormalidades en el comportamiento, síntomas gastrointestinales y anorexia moderada. El evento clínico más característico de este paciente fue un comportamiento enmarcado dentro del espectro autista. Con un peso normal al nacer, presentaba microcefalia (perímetro craneal de 33cm, -2 SD) y un test de Apgar de 9/10/10

En el segundo paciente (P.BCKDK_2), el retraso psicomotor apareció desde el primer mes de vida, y no empezó a andar hasta los 22 meses de edad, acudiendo al hospital San Cecilio (Granada) a los dos años por un severo retraso en el desarrollo. De nuevo, el retraso en desarrollo y las anormalidades en el comportamiento, clasificadas dentro del espectro autista, fueron los síntomas neurológicos más relevantes. El peso al nacer fue normal, y el test de Apgar de 9/10/10. En el examen físico a los dos años se describió un cuello corto, nariz bulbosa y falanges distales reducidas. No se detectaron lesiones en la piel, y aunque la altura era normal, presentaba microcefalia (perímetro craneal de 46cm, -2,5 SD).

Alertados por la clínica, los pacientes fueron referidos a los laboratorios de análisis (el servicio de bioquímica del Hospital Sant Joan de Deu para el paciente BCKDK_1 y el CEDEM en el caso del paciente BCKDK_2) para realizar un perfil metabólico. Ambos pacientes mostraban una disminución drástica de BCAA en plasma y LCR, tal y como se resume en la **tabla 11**. Concretamente, para el paciente BCKDK_1 la reducción de BCAAs era de entre 5 y 10 veces respecto a los controles, y para el paciente P.BCKDK_2, de 3 a 5 veces. El perfil metabólico de estos pacientes se asemejaría a un “anti-MSUD”, observándose una disminución de metabolitos en lugar de una acumulación tóxica.

1.3| Presentación clínica y bioquímica del paciente BCATm

Este paciente fue derivado al laboratorio de diagnóstico bioquímico del CEDEM al detectársele en el cribado neonatal ampliado niveles aumentados de BCAAs en fluidos corporales, pero normales para los BCKAs.

Como se muestra en la **tabla 11**, se detectó un aumento de entre 3 y 4 veces en los niveles de BCAAs en suero, con valores normales para los cetoácidos –a excepción del α -ceto- β -metilvalérico, para el que se observaron valores ligeramente aumentados. En orina no se realizó medida de oxoácidos, pero se vieron aumentos muy marcados en las concentraciones de α -cetoglutarato (α KG). Los valores de aminoácidos en los controles que siguieron fueron normalizándose, y desde el día 21 de vida fue puesta en tratamiento con poca lactancia materna y suplementación con fórmula incorporando los

requerimientos mínimos de BCAAs. A día de hoy, lleva una dieta con muy baja restricción proteica.

1.4 | Otros pacientes incluidos en el estudio

En este trabajo se han incluido muestras de otros dos pacientes diagnosticados de Jarabe de Arce como modelos de estudio en diferentes estudio. Los datos más relevantes de dichos pacientes son:

33

P.MSUD_1: Diagnosticado como una forma clásica de MSUD. Mujer nacida en 2001, de etnia gitana. Portadora homocigota de la mutación *BCKDHB* c.853C>T (p.R285X), con una actividad residual del complejo BCKDH de un 2,5% frente a controles intraensayo.

P.MSUD_2: Diagnosticado como una forma variante de MSUD. Varón nacido en 2002, portador de las mutaciones c.647C>T (p.A216V) y c.889C>T (p.R297C), con una actividad residual del complejo BCKDH de un 30% frente a controles intranesayo.

2 | Materiales

34

En esta sección se especifican los detalles técnicos de los materiales utilizados, distinguiendo por la naturaleza de estos y no por el empleo de los mismos, que se abordará en el siguiente punto.

2.1 | Muestras de fibroblastos de pacientes y controles

Para los análisis que comprenden este estudio hemos utilizado fibroblastos primarios de dichos pacientes, así como fibroblastos de controles y de otros pacientes con otras patologías. Los datos relativos a cada línea celular se resumen en la **tabla 2**.

Tabla 2_ Células utilizadas:

Código	Muestra	Procedencia	Nombre comercial	Sexo
C	Fibroblastos control	Lonza	cc2509	ND
C	Fibroblastos control	Coriell Institute	GM8680	V
C	Fibroblastos control	Coriell Institute	GM8333	V
P.PP2Cm	Fibroblastos paciente	H. Ramón y Cajal	NP	M
P.BCKDK_1	Fibroblastos paciente	H. Sant Joan de Deu	NP	V
P.BCKDK_2	Fibroblastos paciente	H. San Cecilio	NP	V
P.BCATm	Fibroblastos paciente	H. La Paz	NP	M
P.MSUD_1	Fibroblastos paciente	H. V. Arrixaca	NP	M
P.MSUD_2	Fibroblastos paciente	H. V. Arrixaca	NP	V

NP= No procede; ND= No determinado; V= Varón; M= Mujer

Las muestras de pacientes son fibroblastos procedentes de biopsias de piel obtenidas con el consentimiento informado de los padres y por el hospital que remitió las muestras. Toda la investigación llevada a cabo con este material está autorizada por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respetando los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración universal de la UNESCO sobre el programa Genoma Humano y Derechos Humanos.

En los experimentos de caracterización de mutaciones mediante la expresión transitoria de un plásmido conteniendo el gen en estudio utilizamos células COS7, fibroblastos de riñón de mono verde africano, transformados mediante un mutante defectivo de SV40.

Para el empaquetado de partículas lentivirales utilizamos células HEK293T, originadas a partir de la línea celular HEK293 (células embrionarias de riñón humano transformadas mediante adenovirus).

Todas las células, salvo que se indique lo contrario, fueron cultivadas en medio de cultivo MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado con glutamina 2 mM, 10% v/v suero bovino fetal (FBS) y antibióticos, en condiciones de cultivo estándar (atmósfera de humedad relativa del 95%, 5% CO₂ y a 37 °C). Para recogerlas, fueron tratadas con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,02%, y sedimentadas mediante centrifugación. Las células se conservan congeladas en suero fetal con DMSO al 5% en N₂ líquido. En todos los ensayos, y salvo que se indique lo contrario, los fibroblastos se encontraban a un 80% de confluencia en el momento del experimento y entre 6 y 13 pases.

En experimentos en los que se cambió a un medio más oxidativo, las células fueron crecidas en DMEM en el que se sustituyó la glucosa por galactosa 1g/L durante 24h.

2.2 | Vectores

A lo largo de este trabajo hemos utilizado distintos vectores, para expresar transitoriamente el cDNA de los genes en estudio y para generar partículas lentivirales con las que infectar células con un plásmido conteniendo shRNA.

Tabla 3_Vectores utilizados:

Plásmido	Descripción	Uso	Casa comercial
pT-REX/DEST30	Vector clonaje para el gen <i>PPM1K</i> en sus formas wt y mutadas	Expresión transitoria para la caracterización molecular de PP2Cm	Invitrogen
pEZ-Lv205 (EX-M0284-Lv205)	Vector clonaje para el gen <i>BCKDK</i> co-expresado con la proteína GFP	Expresión estable para la caracterización molecular de BCKDK	GeneCopoeia
pLKO.1	Vector conteniendo las secuencias para los shRNA utilizados	Inhibición de la expresión del gen <i>BCKDK</i>	Sigma Aldrich
pCMV-dR8.74	Vector empaquetador del plásmido en partículas lentivirales	Generación de partículas lentivirales para la infección con los shRNA	Addgene
pMD2.G	Vector para generar la cápsida de las partículas lentivirales	Generación de partículas lentivirales para la infección con los shRNA	Addgene

2.3 | Reactivos y otros materiales

Las tablas 4 a 7 recogen la información relativa a los sustratos, sondas fluorescentes, kits, reactivos y demás tampones y soluciones empleados en este trabajo.

36

Tabla 4_Reactivos:

Reactivo/ Producto	Referencia	Casa comercial	Uso
[1- ¹⁴ C]-Leucina	6109-63-3	Amersham	Medida de la actividad descarboxilativa de BCKDH
[U- ¹³ C]-leucina	CLM-468-1	Cambridge Isotope Laboratories	Rastreo de isótopos mediante MS/MS
2-Deoxy-D-glucosa	D6134	Sigma Aldrich	Medida de ATP
4-12% NuPage Precast Gels	NP0335	Invitrogen - Life Technologies	Western Blot
Adenosine 5'-diphosphate monopotassium salt dihydrate (ADP)	A5285	Sigma Aldrich	Valoración de la sensibilidad en la formación de mPTP
Agarose D1 Low EEO	8010	Conda	Análisis de PCR
Albumin, bovine serum, FA free	A6003	Sigma Aldrich	Estándar para cuantificación de proteínas
Antimicina A	A8674	Sigma Aldrich	Valoración de la tasa de consumo de oxígeno (Seahorse)
Biorad Protein Assay (reactivo de Bradford)	500-006	Biorad	Cuantificación de proteínas
Blot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular	IB3010-01	Invitrogen - Life Technologies	Western Blot
Carbonyl Cyanide 4-(trifluorometoxy) Phenyl (FCCP)	C2928	Sigma Aldrich	Valoración de la tasa de consumo de oxígeno (Seahorse)
Ciclosporina A	C3662	Sigma Aldrich	Valoración de la sensibilidad en la formación de mPTP
Complete mini EDTA free	11 836 170 001	Roche	Extracción de proteínas
Digitonina	D141	Sigma Aldrich	Valoración de la sensibilidad en la formación de mPTP Seahorse
ECL Western Blotting Detection	RPN 2209	GE Healthcare Life Science	Western Blot
FBS (Fetal Bovine Serum)	F-7524	Sigma Aldrich	Cultivos celulares
Formalina	H-T501128	Sigma Aldrich	Microscopía
Glucosa	8346	Merck	Medida de la actividad descarboxilativa de BCKDH
Glutamina	25030-081	Gibco BRL	Cultivos celulares
JetPEI	101-10N	Polyplus Transfection	Transfección de DNA
L-Leucina	7875	Sigma Aldrich	Medida de la actividad descarboxilativa de BCKDH
Lipofectamina + Plus reagent	18324-012	Invitrogen - Life Technologies	Transfección de DNA
Lipofectamina LTX	15338-100	Invitrogen - Life Technologies	Transfección de DNA
MEM (Minimun Essential Medium)	10600001	GE Healthcare Life Science	Cultivos celulares
Nitrocellulose blotting membrane 0,2 µm	LC5800	Invitrogen - Life Technologies	Western Blot
Novex Sharp Pre-Stained Protein Standards	NP0002	Invitrogen - Life Technologies	Western Blot
NuPAGE MES SDS Running Buffer	O4876	Sigma Aldrich	Western Blot
Oligomicina	31985-047	Invitrogen - Life Technologies	Valoración de la tasa de consumo de oxígeno (Seahorse)
OptiMEM I Reduced Serum Medium Liquid-with glutamine	04 906 837 001	Roche	Western Blot
PhosphoSTOP	-	BD-Falcon	Western Blot

Placas y botellas de cultivos	4710444001	Roche	Cultivos celulares
Polimerasas FastStart	50547	Lonza	PCR
Prosieve Protein Marker	R8875	Sigma Aldrich	Western Blot
Rotenona	K0629	Sigma Aldrich	Valoración de la sensibilidad en la formación de mPTP
Sodium 4-metil-2-oxovalerato	S-7501	Sigma Aldrich	Varios
Succinato	15596028	Life Science	Valoración de la sensibilidad en la formación de mPTP
Tripsina			Cultivos celulares
Trizol			Aislamiento de RNA

Tabla 5_Kits comerciales:

Kit	Referencia	Casa comercial	Uso
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	11 699 695 001	Roche	Medida de ATP
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4337455	Applied Biosystems	Secuenciación
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation kit	03730972001	Roche	Aislamiento de ácidos nucleicos
Mitochondria Isolation Kit- human	130-094-532	Miltenyi Biotec	Extracción de la fracción mitocondrial
Qiagen Plasmid Purification Maxi Kit	12163	Qiagen	Aislamiento de DNA plasmídico - Maxiprep
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen	Purificación de banda en gel
Quickchange™ Site Directed Mutagenesis Kit	200524	Agilent Technologies	Mutagénesis
SuperScript Vilo cDNA synthesis kit	11754050	Invitrogen - Life Technologies	RT-PCR
Wizard Plus Miniprep DNA Purification System	A1330	Promega	Aislamiento de DNA plasmídico - Miniprep
β-Gal Assay Kit	K1455-01	Invitrogen - Life Technologies	Medida de la actividad β galactosidasa

Tabla 6_Sondas fluorescentes:

Sonda	Referencia	Casa comercial	Uso
Calcium Green	C-3011MP	Molecular Probes-Invitrogen	Valoración de la sensibilidad en la formación de mPTP
DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)	268298	Merck	Marcaje de DNA, inmunofluorescencia
IP (Ioduro de Propidio)	P4170-25MG	Sigma Aldrich	Marcaje de DNA, citometría de flujo
Mitosox	M36008	Invitrogen - Life Technologies	Valoración de anión superóxido
Mitotracker	M7512	Molecular Probes-Invitrogen	Marcaje de mitocondrias, microscopía confocal
Tetrametil rodamina metil ester (TMRM)	T-668	Molecular Probes-Invitrogen	Valoración del potencial de membrana mitocondrial

Tabla 7_Soluciones y tampones:

Solución	Composición	Uso
TBS	TrisHCl 50 mM, NaCl 276 mM, KCl 54 mM pH 8	Varios
Tampón Laemmli 4x	SDS 8%, β mercaptoetanol 20%, Glicerol 40%, Tris 0,125 M, 0,008% Azul de bromofenol	Carga de proteínas en SDS-PAGE
Tampón electroforesis	Tris - Glicina - SDS 10%	SDS-PAGE
Tampón de lisis RIPA	NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, Deoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1%, Tris pH 8 50 mM, inhibidores de proteasas y fosfatasas	Lisis de células
Tampón de lisis	Tris 100 mM, 4 mM EDTA, pH 7,75	Lisis de células para medida de ATP
TAE	Tris-Acetato 40 mM, EDTA 2 mM	Electroforesis de ácidos nucleicos
Solución lavado	TBS 1x, Tween-20 0,05%	Lavado membranas Western Blot
Solución Deshibridación	TBS 1x, Tween-20 0,05%, glicina 0,2 M	Deshibridación de membranas Western Blot
Solución bloqueo	TBS 1x, Tween-20 0,05%, leche en polvo 5% p/v	Bloqueo de membranas Western Blot
Poliacrilamida	Acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%	Geles SDS-PAGE
PBS	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, PO ₄ HNa ₂ ·12H ₂ O 8 mM, PO ₄ H ₂ K 1,5 mM	Varios
NuPAGE MES SDS Running Buffer	MES 50 mM, Tris base 50 mM, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, pH 7,3	SDS-PAGE
Tampón Krebs-Ringer fosfato	NaCl 0,154 M, KCl 0,154 M, CaCl ₂ 0,11 M, MgSO ₄ 0,154 M, KH ₂ PO ₄ 0,154 M	Medida de la actividad descarboxilativa de BCKDH
Tampón de fijación	Paraformaldehído 4%, glutaraldehído 2% en tampón fosfato Na/Na ₂ 0,1 M pH 7,4	Microscopía electrónica
Tampón MSK	KCl 125 mM, MgCl ₂ 3 mM, HEPES 20 mM, KH ₂ PO ₄	Valoración de la sensibilidad en la formación de mPTP

2.4 | Anticuerpos

Hemos utilizado en los distintos experimentos los siguientes anticuerpos para la detección de las proteínas indicadas en la **tabla 8**, en las condiciones que en la misma se especifican.

Tabla 8_Anticuerpos:

39

Anticuerpo	Proteína/ Diana	Uso - Dilución	Referencia	Casa comercial
Anti-4E BP1 (53H11)	4E BP1 total	WB, 1:1000	9644	Cell Signaling
Anti-BCAT2	BCATm	WB, 1:1000	9432	Cell Signaling
Anti-BCKDHA	BCKDHA	WB, 1:1000	ab68094	Abcam
Anti-BCKDHB	BCKDHB	WB, 1:500	sc-160974	Santa Cruz Biotechnology
Anti-BCKDK	BCKDK	WB, 1:1000; IF, 1:100	ab111716	Abcam
Anti-CS	Citrato Sintasa	WB, 1:1000 (2h)	C5498	Sigma Aldrich
Anti-DBT	DBT	WB, 1:1000	ab88471	Abcam
Anti- p44/42 MAPK (Erk1/2)	ERK1/2 total	WB, 1:1000	9102	Cell Signaling
Anti-Glutathione Peroxidase 1	GPX	WB, 1:1000	ab22604	Abcam
Anti-hsp60	Hsp60	WB, 1:1000 (2h)	SPA-829	Stressgene
Anti-JNK2	JNK2 total	WB, 1:1000	4672	Cell Signaling
Anti-LAMP1 (C54H11)	LAMP1 (glicosilado y sin glicosilar)	WB, 1:1000	3243	Cell Signaling
Anti-LC3B	LC3B I y II	WB, 1:1000	2775	Cell Signaling
Anti-MFN2, clone 4H8	MFN2	WB, 1:1000	H00009927	Abnova
Anti-SOD2	MnSOD	WB, 1:25000	ADI-SOD-111	Enzo
Anti-OPA1	OPA1	WB, 1:1000	612607	BD Biosciences
Anti-phospho - p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	P- ERK1/2	WB, 1:1000	9101	Cell Signaling
Anti-phospho 4E BP1 (Ser65)	P-4EBP1	WB, 1:1000	9451	Cell Signaling
Anti-phospho-BCKDE1A	P-BCKDHA	WB, 1:4000	A303-567A	Bethyl
Phospho-BCKDE1A (S293) blocking peptide	Péptido de bloqueo para A303-567A		BP303-567P	Bethyl
Anti-phospho- SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	P-JNK2	WB, 1:1000	9251	Cell Signaling
Anti-phospho- p38 MAP Kinase	P-p38	WB, 1:1000	9211	Cell Signaling
Anti-p38 α MAP Kinase	p38 total	WB, 1:1000	9228	Cell Signaling
Anti-PPM1K	PP2Cm	IF, 1:300	HPA020066	Sigma Aldrich
Anti-PPM1K	PP2Cm	WB, 1:1000	ab96763	Abcam
Anti-Tubulina	Tubulina	WB, 1:1000	T 9026	Sigma Aldrich

2.5 | Oligonucleótidos

Para la amplificación de DNA, secuenciación y mutagénesis utilizamos los siguientes oligonucleótidos.

40

Tabla 9_Oligonucleótidos:

Gen	Nombre	Uso	Secuencia 5'-3'
<i>PPM1K</i>	PPM1K-3S	Amplificación exón 2	CTGTCTGCTGATGCAACTCTT
<i>PPM1K</i>	PPM1K-4AS	Amplificación exón 2	TACAACCAGTTCAATACCATC
<i>PPM1K</i>	PPM1K-delTA	Mutagénesis dirigida	CAGCTGATTCTGTACCCACATGGAGAAATG
<i>PPM1K</i>	PPM1K-cDNA-S	Amplificación cDNA	GTCTTTGGAGCTGAGTTATGTC
<i>PPM1K</i>	PPM1K-cDNA-AS	Amplificación cDNA	CACTGACTTGTGCGCTGATCTAG
<i>BCKDK</i>	BCKDK-6A	Amplificación exón 7	AAGCTGACAGACTTCCCTCC
<i>BCKDK</i>	BCKDK-7B	Amplificación exón 7	GATCCCCAGCCAGTCTC
<i>BCKDK</i>	BCKDK-12A	Amplificación exón 13	CCCAGTCAGGACCCATGC
<i>BCKDK</i>	BCKDK-12B	Amplificación exón 13	CCATGTAAGTCCATCTGTCTGG
<i>BCKDK</i>	BCKDK-1S	Amplificación cDNA	TCAGTCCTAGCGGATCCTCTG
<i>BCKDK</i>	BCKDK-1AS	Amplificación cDNA	AGGCTGGTCGGGTGAGCAGG
<i>BCKDK</i>	BCKDK-566S	Amplificación cDNA	CAGAGGGCCTACGTGAGAGCC
<i>BCKDK</i>	BCKDK-745-AS	Amplificación cDNA	CTTCTTTGGTGAGAGACGAGTAC
<i>BCAT2</i>	BCAT2-11S	Amplificación exón 11	ACAGTCCGTAGGCACTCG
<i>BCAT2</i>	BCAT2-11AS	Amplificación exón 11	CGCTGGCCTTTTATTTCTG

3 | Métodos

41

En este apartado abordamos los métodos que utilizamos a lo largo del trabajo. Se organizan según la finalidad conceptual de los mismos, encontrándose así repetido en ocasiones el mismo experimento a lo largo de los resultados.

3.1 | Aislamiento y trabajo con ácidos nucleicos

A) Aislamiento de ácidos nucleicos en células

El aislamiento de ácidos nucleicos de las distintas muestras utilizadas en este trabajo se realizó siguiendo el protocolo y las recomendaciones de los proveedores de cada uno de los kits de aislamiento empleados.

La preparación de las muestras para ello fue:

A) mediante la tripsinización de las células en cultivo y posterior lavado con PBS, seguido de una precipitación centrifugando 5' a 490 rcf, formando un pellet homogéneo, cuando el material eran fibroblastos en cultivos.

B) por centrifugación de un cultivo bacteriano crecido a 37 °C O/N en agitación cuando se extraía DNA plasmídico.

Las técnicas para la extracción de los distintos ácidos nucleicos dependieron de la naturaleza de los mismos.

B) Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos.

La cuantificación y pureza de ácidos nucleicos se analizó en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific), teniendo en cuenta la relación $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$. El análisis de los fragmentos de cDNA, DNA plasmídico y gDNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa en cubetas de desarrollo horizontal acopladas a una fuente de energía con un tampón de electroforesis TAE (descrito en la tabla 7).

Tras la electroforesis, el tamaño de las bandas se analizó con un transiluminador acoplado a una cámara para comparar, sobre la imagen, las bandas obtenidas con distinto peso molecular conocido *DNA Molecular Weight Marker V, II y φ 29* (CBMSO).

C) Amplificación de gDNA y cDNA

42

Amplificación de gDNA: se ha empleado un protocolo de PCR estándar ajustándolo en cada caso según la longitud del amplicón y la temperatura de *melting* de los oligonucleótidos (descritos en la tabla 8). Se amplificaron entre 250 y 500 pares de bases de DNA utilizando polimerasa *FastStart* en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). Tras la amplificación, los productos de PCR se analizan en un gel de agarosa del % adecuado al tamaño esperado con bromuro de etidio al 4% (v/v).

Amplificación de cDNA: obtuvimos cDNA por retrotranscripción (RT-PCR) partiendo de 1,5 mg de RNA total mediante el kit *SuperScript III First Strand Synthesis for RT-PCR* y oligodT según las recomendaciones del proveedor. Posteriormente amplificamos el cDNA obtenido mediante PCR con oligonucleótidos específicos (ver tabla 8) y la polimerasa *FastStart*. Los productos de PCR se separaron y visualizaron en un gel de agarosa para determinar su tamaño y/o purificar las bandas para su posterior secuenciación.

D) Purificación de productos de PCR y secuenciación

Tras la amplificación, los fragmentos de DNA se purificaron con *SpinClean PCR Purification Kit* para su posterior secuenciación. Los fragmentos de DNA separados en geles de agarosa se purificaron utilizando el kit *QIAEX II Gel Extraction*.

Una vez purificados, los fragmentos de DNA se secuenciaron mediante el método enzimático de terminación de cadena de DNA por incorporación de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs). Se emplearon para ello 300 ng de DNA para los productos de PCR y de 300 a 500 ng para las construcciones plasmídicas; oligonucleótidos específicos a una concentración de 5 mM y el kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing*. Los productos obtenidos se resuelven por electroforesis capilar en un secuenciador automático *ABI Prism 3730* de Applied Biosystems.

E) Mutagénesis dirigida

Para realizar la mutagénesis dirigida sobre el gen *PPM1K* (deleción de dos pares de bases, *PPM1K* c.417_418delTA) se partió del plásmido pT-REX/DEST30 conteniendo la forma wild type del gen. La mutagénesis se realizó mediante el kit *Quickchange™ Site Directed Mutagenesis* siguiendo las recomendaciones del proveedor y empleando los nucleótidos específicos que se indican en la tabla 8, que incorporaban la deleción a introducir.

Una vez terminada la PCR para la generación de los mutantes, se transformaron bacterias *XL1-Blue* (Stratagene).

F) RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Para realizar las PCR cuantitativas, se utilizó SYBR Master Mix (Applied Biosystems) y oligonucleótidos específicos (especificados en la tabla 8). La amplificación y el análisis se realizó en un equipo *LightCycler 480*, de Roche, y los datos fueron normalizados utilizando el gen de expresión constitutiva *GAPDH*. Los resultados se expresan como el parámetro “Relative Quantity (RQ)”, que nos permite comparar la cantidad de mRNA en los distintos extractos. Para ello, se realizó el análisis matemático de los datos crudos obtenidos (el *crossing threshold* (Ct) o *crossing point* (Cp) de la siguiente manera:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ del gen en estudio}) - (Ct \text{ del gen constitutivo, GAPDH})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ de una muestra} - \Delta Ct \text{ de la muestra de referencia}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

43

Array de expresión de genes de apoptosis

Valoramos la expresión de 84 genes relacionados con la apoptosis (proapoptóticos y antiapoptóticos), mediante el kit ‘*RT2 Profiler™ PCR Apoptosis Arrays* de SABiosciences compatibles con el *LightCycler 480 apparatus 96-well Block* (Roche Applied Science). Para ello, extrajimos el RNA de fibroblastos del paciente PP2Cm y de un control. Para cada ensayo se correrán por duplicado tres réplicas biológicas de pacientes y al menos tres muestras de RNA de diferentes controles. El *array* incluye sondas para cuantificar la expresión de 84 genes implicados en apoptosis.

G) Secuenciación de Sanger y nomenclatura de mutaciones

La secuenciación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo empleando el método enzimático de terminación de cadena de DNA por incorporación de dioxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), descrito por Sanger (ref). Se empleó el *Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems) con la posterior resolución en un secuenciador automático *ABI Prism 3730* (Applied Biosystems).

Las mutaciones se han nombrados siguiendo las recomendaciones de la *Human Genome Variation Society*, y utilizando el soporte informático *Mutalyzer*.

H) Análisis de ausencia de variantes en población control

La determinación de la ausencia de una variante determinada en alelos control étnicamente similares

se ha realizado de diferentes maneras complementarias:

a) mediante un análisis *in silico* de bases de datos de población control como 1000 genomas, Exome Variant Browser o ExAc Browser

44

b) mediante secuenciación de alelos control del fragmento de interés

c) mediante el análisis de una PCR a tiempo real seguida de una curva de fusión por HRM (*High Resolution Melting*). Para ello se usó *High Resolution Melting Master Mix* (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor y el proceso se monitorizó en un *LightCycler®480* (Roche). Las curvas de fusión se normalizan y agrupan según su temperatura de fusión con *LightCycler® 480 Gene Scanning Software* (Roche), que utiliza un algoritmo basado en la similitud de las curvas para identificar las muestras wild-type y diferenciarlas de las muestras mutantes.

Tanto para la secuenciación como para el análisis por HRM se utilizaron los alelos control contenidos en el panel *Human Random Control DNA Panel-1 HRC-1* (ECAA y Sigma-Aldrich).

3.2 | Detección de proteínas

La detección de proteínas se realizó con dos abordajes diferentes, según cada situación:

A) Separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE y posterior electrotransferencia a nitrocelulosa e inmunodetección

Para la obtención de la fracción proteica de los fibroblastos en cultivo, se tripsinizaron y lavaron con PBS, para luego centrifugarlos 5' a 490 rcf. Tras eliminar el sobrenadante, se resuspendió el pellet en tampón de lisis (descrito en la tabla 7) con los inhibidores de proteasas y fosfatasa indicados en la tabla 4. Las células fueron entonces incubadas 30' a 4°C en agitación y centrifugadas 5' a 16 rcf, descartándose el sedimento y conservando el sobrenadante en hielo, que corresponde a la fracción proteica clarificada.

Para la detección de algunas proteínas fue necesario el aislamiento de la fracción mitocondrial. Para ello, sometimos el pellet correspondiente a los fibroblastos de entre dos y tres millones de células a una cromatografía de afinidad con el kit *Mitochondria Isolation – human*, de Miltenyi Biotec, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tras cuantificar la cantidad de proteína de los extractos proteicos mediante la técnica de Bradford utilizando BSA como estándar, cargamos en un gel entre 25 y 50 mg de extracto proteico. Esta cantidad

de proteína se diluyó con tampón de carga Laemmli 4x (tabla 7) y agua hasta un volumen máximo de 35 mL y se hirvió la muestra durante 5'.

La separación electroforética se llevó a cabo en los sistemas NuPAGE del 4-12% de gradiente acrilamida de Invitrogen, utilizando MES como tampón de electroforesis o los geles *Precast* 12% de Biorad, utilizando un tampón de electroforesis como el descrito en la tabla 7. Para determinar los pesos moleculares de las proteínas empleamos como marcador de peso molecular *ProSieve™ Color Protein Markers* de Lonza. Los geles corrieron a un voltaje constante de 120V durante el tiempo necesario para separar las bandas del peso molecular esperado.

Tras la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 mM con el sistema *iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular* durante 7' a 20V. Comprobamos la eficiencia de la transferencia mediante la tinción de las membranas con el reactivo Rojo Ponceau. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS Tween 0,05% durante al menos 2 h en agitación, y se incubaron con el anticuerpo primario diluido a las concentraciones establecidas en la tabla 8 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras lavar tres veces durante 5' con TBST, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente unido a peroxidasa (HRP) durante 2 h en agitación. Pasadas las dos horas de incubación, se lavaron las membranas con TBST y se procedió a la detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando ECL o Femto, según correspondiese, y películas de rayos X RP2 PLUS.

Para escanear las películas y densitometrar las bandas obtenidas se utilizó el escáner de BioRad G-8000 y el soporte informático *Quantity One*, también de BioRad.

En los casos en los que se realizó más de una detección sobre la misma membrana, incubamos la misma –rehidratada con TBST– con solución de deshibridación (ver Tabla 7) durante 20' a 80 °C, volviendo luego a bloquear y seguir con el protocolo de inmunodetección descrito.

Puesta a punto de la detección de P-BCKDHA

Para validar la especificidad de reconocimiento del epítipo P-Ser293 BCKDE1a por el anticuerpo anti P-BCKDE1a (A303-567A, Bethyl), se utilizó un péptido de bloqueo específico que interrumpe la interacción antígeno-anticuerpo (BP303-567P, Bethyl). La disrupción máxima fue obtenida tras la incubación de 4 µg de anticuerpo con 20 µg de péptido de bloqueo previo al Western blot, que procedió con normalidad.

En la **figura 4** se muestra cómo la incubación con el péptido de bloqueo elimina la banda específica correspondiente al residuo fosforilado de todo el resto de bandas que aparecían en el Western blot normal.

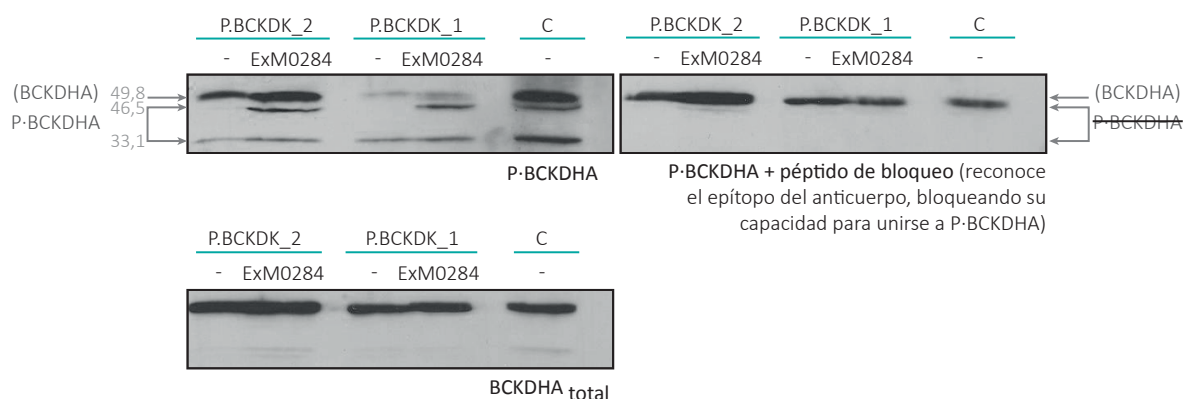


Figura 4_ Especificidad del anticuerpo anti-P-BCKDEla: Western blot representativo de extractos mitocondriales de los pacientes BCKDK y controles sin infectar o infectados con el plásmido que expresa la forma wt del gen (ExM0284), hibridado contra P-BCKDHA, BCKDHA total o P-BCKDHA + 20 ug de péptido de bloqueo.

B) Detección de proteínas mitocondriales por inmunofluorescencia

Para la detección de proteínas mitocondriales por inmunocitoquímica, cultivamos los fibroblastos sobre cubreobjetos redondos de cristal. Realizamos una tinción de las mitocondrias mediante una incubación durante 40' a 37 °C con la sonda fluorescente Mitotracker-Red a una concentración de 500 nM diluida en MEM. Tras un lavado con PBS, fijamos las células con formalina 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Sobre las células fijadas realizamos la inmunodetección, permeabilizando las células con la solución de permeabilización indicada en la Tabla 7, y bloqueo durante 30' con la solución indicada en la misma tabla. La incubación con el anticuerpo primario se realizó O/N en un ambiente húmedo a 4 °C en agitación. Tras tres lavados de 5' con PBST, se incubó con el anticuerpo secundario durante 30'.

Para la tinción del núcleo, se incubó la muestra con DAPI durante 5', en la concentración indicada en la tabla 6.

Finalmente, y tras lavar otra vez con PBST tres veces durante 5', se deshidrató las células mediante tres lavados cortos por inmersión en etanol.

3.3 | Expresión de transcritos mediante transfección

Para la expresión de transcritos (cDNA o shRNA) se utilizaron dos métodos diferentes, según se pretendiese una expresión transitoria o estable.

A) Transfección para la expresión transitoria de un vector en células eucariotas

Para la expresión transitoria del gen *PPM1K* en su forma wt o mutada, contenida su secuencia codificante en el vector pT-REX/DEST30 (indicado en la tabla 3), transfectamos las células con lipofectamina LTX. Para ello, paqueamos 24 h antes del ensayo, 200.000 células por pocillo de placa p6 (9,6 cm² de superficie de cultivo), de tal manera que estaban a un 80% de confluencia en el momento de transfección.

El protocolo de transfección seguido fue el recomendado por la casa comercial. Se mezclaron 3 mg de DNA y 2 mL de lipofectamina LTX en 500 mL de optiMEM, que se añadieron a las células plaqueadas tras 30' de incubación a RT. Las células se recogieron 24h tras la transfección.

En aquellos experimentos en los que fue necesario valorar la eficiencia de transfección, co-transfectamos el mencionado vector con el plásmido pT-REx/DEST30-LacZ, que codifica para la proteína β -galactosidasa, permitiendo medir la actividad de la misma.

B) Infección mediante lentivirus para la expresión estable de un vector en células eucariotas

Para la expresión estable de los plásmidos conteniendo el cDNA del gen *BCKDK* (Ex-Lv205-M0284) o los shRNA para la interferencia del mismo (vector pLKO.1), identificados en la tabla 3, se infectó a los fibroblastos con los mismos mediante el empaquetamiento de los plásmidos en partículas lentivirales.

Para la generación de los lentivirus se transfectaron células HEK293T con los plásmidos empaquetadores y codificantes para las cápsidas virales, así como con el plásmido de interés. La transfección se realizó con lipofectamina y Plus Reagent (ver tabla 4). 24h después de la transfección, se cambió el medio a las células HEK293T, añadiendo medio MEM fresco durante otras 24h. Pasado ese tiempo, se recogió el medio extracelular y se filtró con una jeringuilla y filtros de 0,45 μ m, obteniendo un medio limpio de células y con las partículas lentivirales en el mismo. No se tituló la concentración de lentivirus, pasándose a añadir 1 mL de dicho medio a los 5 mL de medio de una placa de los fibroblastos a interferir, con polibreno 4 μ g/mL.

3.4 | Determinación de la actividad enzimática del complejo BCKDH

La determinación de la actividad enzimática del complejo BCKDH se midió como la tasa de descarboxilación de [1-¹⁴C]-leucina, utilizando el método de Wendel modificado (Wendel, 1973).

El experimento se realizó sobre células cultivadas en dos pocillos de p6 y recogidas por tripsinización. Tras centrifugar, el *pellet* fue resuspendido en 300 mL de glucosa 2 mM. Esta suspensión celular se añadió a la mezcla de reacción, que contenía, en un volumen total de 100 mL, 50 mL de suspensión celular y L-leucina 0,1 mM, glucosa 10 mM, [1-¹⁴C]-leucina 0,5 µCi y tampón Krebs Ringer Fosfato.

La actividad o tasa de descarboxilación se midió como el ¹⁴CO₂ liberado por el metabolismo de la [1-¹⁴C]-leucina en fibroblastos intactos, medido en ausencia de inhibidores de kinasas (Duran, 1978), expresada en pmoles de CO₂ liberado en 4 h/ µg de proteína, y corregida por la incorporación de [1-¹⁴C]-leucina a proteínas como control metabólico del experimento. Para medir la incorporación a proteínas, la mezcla de reacción fue recogida con las células y tratadas con ácido tricloroacético a 4°C durante toda la noche, resultando en la precipitación de las proteínas. Éstas fueron resuspendidas con NaOH 0,5 N e incubadas a 60 °C durante 10 minutos. Transferimos 50 µL de esta suspensión de proteínas a un tubo con líquido de centelleo, midiendo la radiactividad desprendida.

La concentración de proteína tanto para la actividad descarboxilativa como para la incorporación a proteínas fue medida mediante el método de Lowry utilizando BSA como estándar proteico.

3.5 | Análisis de metabolitos mediante el marcaje con isótopos estables por MS/MS

Para el análisis de metabolitos en medio extracelular, se sembraron 1,5 x 10⁶ fibroblastos en una placa p100 crecidos en condiciones normales de cultivo, y a los que se añadió una vez sembrados 5 mL de medio MEM libre de BCAA y suplementado con [U-¹³C]-leucina 0,8 mM. Pasadas las 24h de incubación, se recogió y centrifugó el medio, procesándose para la medida de metabolitos. Se decidió determinar la concentración de metabolitos y no en lisado celular por ser más reproducible en el primerO (Kell, Brown et al. 2005).

Se cuantificó la concentración de [U-¹³C]-α-cetoisocaproico por HPLC-MS/MS como su derivado quinoxalinol, utilizando o-fenildiamina. El sistema utilizado es un HPLC 1100 de Agilent Series,

acoplado con un API 2000 QTrap de Applied Biosystem. Como estándar interno utilizamos $[5\text{-}^2\text{H}_3]\text{-}\alpha\text{-cetoisocaproico}$ a una concentración final de 20 μM . Los metabolitos se detectaron por monitoreo de reacción múltiple (MRM) en modo positivo. Las transiciones para MRM fueron 201>158 para $\alpha\text{-cetoisocaproico}$, 204>158 para el $[5\text{-}^2\text{H}_3]\text{-}\alpha\text{-cetoisocaproico}$ y 207>161 para el $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-}\alpha\text{-cetoisocaproico}$.

3.6 | Técnicas de citometría de flujo

Se han utilizado diferentes técnicas de citometría de flujo, para la detección de especies reactivas de oxígeno, progresión del ciclo celular y potencial de membrana mitocondrial. En todos los casos se ha parado la adquisición de muestra para su posterior análisis al llegar a 10.000 eventos dentro del rango de detección preestablecido.

A) Medida de la concentración de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$): sonda MitoSOX

La medida de anión superóxido en fibroblastos se realizó utilizando la sonda MitoSOXTM-Red (Life Technologies), que emite fluorescencia detectable en el canal rojo al oxidarse por la presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Para ello, incubamos fibroblastos vivos sembrados a una densidad de 150.000 células por pocillo de placa p6 el día anterior con la sonda a una concentración de 5 μM durante 10' a 37 °C, tal y como recomienda el fabricante. Pasado ese tiempo, las células fueron lavadas y tripsinizadas, para ser resuspendidas en PBS completo y analizadas por citometría de flujo en un sistema FACSCalibur (BD Bioscience). La sonda se excita a una longitud de onda λ 510 nm y emite fluorescencia a λ 580 nm.

Para el análisis de los datos se ha utilizado el programa FlowJo.

B) Medida del potencial de membrana mitocondrial: sonda TMRM

Para la medida del potencial de membrana mitocondrial se realizó utilizando la sonda TMRM, que emite fluorescencia detectable en el canal verde (emisión a λ 573 nm) al oxidarse por la presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Para ello, sembramos un día antes del experimento 150.000 células por cada pocillo de p6, dejando un pocillo como control positivo del experimento. El día del experimento, incubamos los fibroblastos vivos con la sonda a una concentración de 0,2 μM durante 10 minutos a 37 °C en oscuridad. Para el control positivo, previo a la incubación con la sonda, tratamos las células con FCCP durante 1 h a una concentración de 50 μM , provocando la despolarización de la membrana mitocondrial.

Las células fueron tripsinizadas y analizadas por citometría de flujo en un sistema *FACSCalibur* (BD Bioscience). Para el análisis de datos se ha utilizado el programa FlowJo.

C) Evaluación de la progresión del ciclo celular: marcaje con IP

La evaluación de la progresión del ciclo celular la realizamos mediante un marcaje de la carga genética con Ioduro de Propidio (IP). Para ello, siguiendo el protocolo descrito por (Alcaide, Merinero et al. 2011), sincronizamos fibroblastos a un 80% de confluencia en una placa p100 mediante la incubación durante 24h con MEM suplementado con 0,5% de FBS. Pasadas las 24h, cambiamos a un medio fresco suplementado con FBS al 10%, permitiendo la progresión normal del ciclo durante 24h. Pasado este tiempo, se tripsinizaron las células y se incubó con IP/RNase Staining Buffer (BD Pharmingen) durante 30' a 37°C en oscuridad. Los datos se adquirieron utilizando el *software* FACSDiva en un citómetro FACSCanto. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo se calcularon en base a su carga genética (2n para la fase G0/G1 y 4n para las fases G2/M) con el soporte informático FlowJo v2.0 TM.

D) Aislamiento de la población celular GFP-positiva post-infección

Tras infectar los fibroblastos con el vector co-expresando el gen de interés con GFP, empaquetado en partículas lentivirales, aislamos la población de células que se habían infectado con éxito (GFP-positivas) mediante un sorter FACS Vantage Turbo Sorter (BD Biosciences, Becton-Dickinson), expandiendo después la población aislada.

3.7 | Evaluación del consumo de oxígeno a tiempo real por respirometría en placa

La tasa de consumo de oxígeno (OCR, Oxygen Consumption Rate) fue medida utilizando el sistema XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Izasa Scientific). Para ello, 24h previo al experimento sembramos 80.000 fibroblastos en microplacas de cultivo XF24 en un volumen total de 250 µL de MEM 10% FBS. Dos horas antes del experimento, el medio de crecimiento fue cambiado por 700 µL de medio MEM 10% FBS fresco, permitiéndole alcanzar una temperatura y pH equilibrados con las condiciones normales de cultivo antes de proceder a la medida.

Tras medir el consumo de oxígeno basal, se inyectaron secuencialmente 50 µL de reactivo, llegando a una concentración final de oligomicina 6 µM, FCCP 50 µM, rotenona 1 µM y antimicina A 1 µM.

Para la normalización final de los datos se cuantificó la cantidad de proteína en cada pocillo de la placa del experimento lisando la célula en la misma placa mediante la incubación con el tampón de lisis RIPA y cuantificación por el método de Bradford.

Los parámetros analizados y la forma de calcularlos se especifica en el correspondiente apartado de resultados.

3.8| Medida de la concentración de ATP celular

Se extrajo el ATP de fibroblastos crecidos en medio normal o tras la incubación durante dos horas con 2'-deoxiglucosa a una concentración 40 mM. recién sedimentados. Para la extracción, se resuspendieron dichos fibroblastos en el tampón de lisis hirviendo especificado en la tabla 7.

51

Se siguieron las recomendaciones del kit comercial utilizado, ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche Applied Science), basado en un sistema de luciferina-luciferasa. La concentración de ATP se normalizó por la concentración de proteína medida en cada ensayo.

3.9| Análisis de ultraestructura mitocondrial mediante microscopía electrónica

En este caso, 1 millón y medio de fibroblastos se fijaron a la placa de cultivo incubando durante una hora a temperatura ambiente con una mezcla de 4% paraformaldehído – 2 % glutaraldehído en un tampón fosfato pH 7,4, y teñidos con una mezcla 1% de tetróxido de osmio y 1% ferricianida potásica en agua destilada durante 1 h a 4 °C. Las muestras fueron deshidratadas con etanol y embebidas en una resina epoxy EML-812 (TAAB Laboratories), aún adherida a la placa de cultivo. Se separaron pequeñas partes de la capa fina de resina conteniendo las células, y fueron pegadas a bloques de resina para cortar secciones ultra finas (70 nm) en una orientación paralela a la base celular. Las secciones fueron recogidas en rejillas teñidas con uranil acetato y citrato, examinándose a 80 Kv en un microscopio electrónico Jeol JEM-1010.

Las imágenes fueron adquiridas con una cámara 4k CMOS F416 (TVIPS).

Las medidas realizadas para el análisis morfométrico se especifican en el apartado correspondiente de Resultados.

3.10| Nuevas tecnologías de análisis masivo del genoma

Se incluyen en este epígrafe el *array* de SNPs para determinar variaciones en el número de copias o reordenamientos genéticos y la secuenciación de Nueva Generación.

A) Array de SNP: análisis de heterocigosidad y variaciones en el número de copias

Se realizó un estudio de 610.000 SNPs repartidos a lo largo de todo el genoma en el Centro de Genotipado Nacional (CEGEN), utilizando el kit 610-Quad Beadchip de Illumina, siguiendo las recomendaciones del mismo. La cuantificación del DNA se realizó mediante el sistema Picogreen

(Invitrogen), y los alineamientos se realizaron utilizando los sistemas Illumina Genome Viewer y Chromosome Browser, ambos *software* de Illumina Genome Studio. Las posiciones genómicas se realizaron según las variantes registradas en el Human Genome Build 37.

B) Secuenciación de 4.810 genes mediante un panel de NGS.

52

El estudio del exoma clínico se ha realizado en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares utilizando el panel de genes *Illumina® Clinical Exome Sequencing (CES) TruSight™ One*, que permite la captura de 4.813 genes asociados a enfermedad y anotados en la base de datos de OMIM. En total se capturan 62.000 exones con 50pb de sus regiones intrónicas flanqueantes.

Las librerías de captura se prepararon siguiendo las recomendaciones del proveedor (Illumina), a partir de 50 ng de DNA extraído con el sistema MagnaPure y cuantificado con PicoGreen. Se secuenciaron lecturas de 250 pb en un secuenciador NextSeq500. Los análisis de calidad de las lecturas así como el mapeado y la anotación de variantes se realizaron con la plataforma Variant Studio, de Illumina.

Los filtros establecidos en el análisis de las variantes anotadas se describen en el correspondiente apartado de Resultados.

3.11 | Soporte informático y análisis estadístico

A lo largo del trabajo se han empleado distintos soportes informáticos, cuyo uso se resume en la tabla 10.

Todos los valores mostrados son valores promedio de *n* experimentos desarrollados independientemente. La significatividad estadística de las diferencias entre los grupos analizados (normalmente pacientes y controles) se obtuvo mediante una prueba T de Student de dos colas, realizada mediante el programa IBM SPSS Statistics v.21. Las diferencias observadas se consideraron significativas según los *p* valores * < 0,05, ** < 0,01 y *** < 0,001.

Tabla 10_Soporte informático:

Programa informático	Uso	URL
BDGP	Predicción de sitios conservados de <i>splicing</i>	www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
BLAST	Alineamiento de secuencias	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Chromas	Análisis de secuencias de DNA	
Ensembl	Consulta de secuencias de DNA	www.ensembl.org/index.html
ExAC Browser	Consulta de SNPs descritos en población control	http://exac.broadinstitute.org
Exome Variant Server	Consulta de SNPs descritos en población control	evs.gs.washington.edu/EVS/
Fiji v1.0	Tratamiento de imágenes de microscopía	fiji.sc/Fiji
FlowJo v. 07	Análisis de datos de citometría	
GenBank NCBI	Consulta de secuencias de DNA	www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
HGMD	Consulta de mutaciones descritas en población	www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
HSFinder v2.4	Predicción de sitios conservados de <i>splicing</i>	www.umd.be/hsf3
Human Genome Variation Society	Nomenclatura de mutaciones	www.hgvs.org
Mutalyzer	Nomenclatura de mutaciones	mutalyzer.nl
PDB (<i>Protein Data Bank</i>)	Consulta de proteínas	www.rcsb.org/pdb/home/home.do
Polyphen 2	Predicción del efecto de mutaciones	genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Primer 3	Diseño de oligonucleótidos	bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
Primer X	Diseño de oligonucleótidos para mutagénesis	www.bioinformatics.org/primerx/
Quantity One	Cuantificación de bandas densitometradas	
Seahorse Flux Analyzer	Análisis de los datos de Seahorse	
SIFT	Predicción del efecto de mutaciones	sift.jcvi.org
SPSS	Análisis estadístico	
Swiss Prot	Consulta de proteínas	web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html
Variant Studio Illumina	Anotación y estudio de las variantes de NGS	

4 RESULTADOS

1 Selección y estratificación bioquímica de pacientes

2 Análisis genético: búsqueda y caracterización de eventos causantes de patología

Deficiencia en proteína fosfatasa PP2Cm

Búsqueda de eventos genómicos: *Array* de SNPs

Identificación de mutaciones en el gen *PPM1K*

Validación del gen *PPM1K* como responsable de patología

Pacientes con alteraciones de comportamiento tipo autista: deficiencia en la proteína BCKD quinasa

Firma metabólica compatible con hiperactividad de BCKDH

Identificación de mutaciones en el gen *BCKDK*

Validación del gen *BCKDK* como responsable de patología

Deficiencia en proteína BCATm

Identificación de cambios candidatos por NGS

Estudio de la patogenicidad del cambio en *BCAT2*

Expresión de los genes de BCKDH

3 Identificación de las vías responsables de patología: impacto de la desregulación del metabolismo de BCAA en la función mitocondrial

Desregulación del metabolismo de BCAA y función mitocondrial

Producción de anión superóxido y defensa antioxidante

Respiración mitocondrial y síntesis de ATP

Ausencia de fosfatasa PP2Cm: diferenciación entre el efecto de los metabolitos y de la proteína

Respiración mitocondrial y el papel de los BCAAs o BCKAS

Sensibilidad al calcio y la formación de mPTP

P2Cm y apoptosis: activación de MAPK y genes de apoptosis

Ausencia de quinasa BCKDK: respuesta de la mitocondria.

Función y dinámica mitocondrial en pacientes BCKDK

Respuesta mitocondrial en ausencia de BCKDK: modelos de interf.

Ausencia de BCKDK: destino celular.



La comprensión del impacto de las alteraciones en el catabolismo de los aminoácidos ramificados sobre el metabolismo celular y su implicación en el desarrollo de distintas patologías permitirá, en un futuro próximo, implementar opciones terapéuticas adaptadas a la individualidades bioquímicas y/o genéticas de los pacientes, influyendo por tanto en la prognosis de su patología.

Estableciendo esta comprensión como objetivo axiomático de la Tesis, hemos diseñado un flujo de trabajo que se resume en la figura 5, en el que, partiendo de la estratificación clínica y bioquímica de cuatro pacientes con sospecha de enfermedad metabólica hereditaria relacionada con dicho catabolismo y sin diagnóstico genético, se han implementado las metodologías genéticas y los estudios moleculares necesarios en cada caso para alcanzar un diagnóstico definitivo. Y desde este diagnóstico, la aproximación posterior al estudio de las rutas celulares implicadas en la enfermedad como base para la comprensión de la fisiopatología.

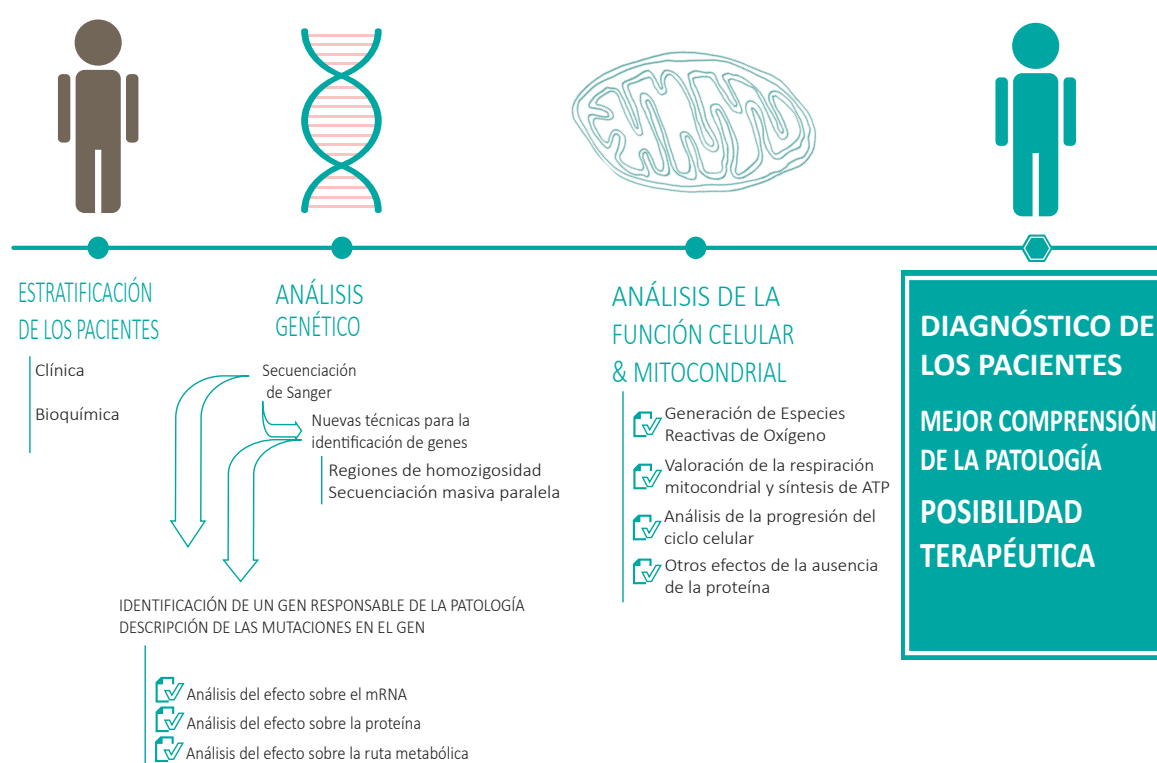


Figura 5_Flujo de trabajo: Partiendo de una estratificación clínica y bioquímica de los pacientes incluidos en este estudio, se hizo el recorrido desde la caracterización del gen y la mutación al estudio de la fisiopatología. Los tres bloques de estudio (estratificación de pacientes, análisis genético y análisis de la función celular y mitocondrial) se corresponden con los tres apartados de los Resultados.

1 | Selección y estratificación bioquímica de los pacientes

59

Aún con la re-definición actual de enfermedad metabólica hereditaria (Morava, Rahman et al. 2015), sigue siendo cierto que la presencia de un patrón metabólico alterado en pacientes con sospecha clínica puede ser un indicio o bien del punto en el que se está produciendo el bloqueo, o, al menos, de que dicha alteración identificada podría ser intrínseca al mecanismo de patogenia. Es por eso que ante una sospecha de enfermedad metabólica sea necesario un estudio de la firma metabólica del paciente.

De los cuatro pacientes incluidos en este estudio, dos procedían de los servicios de Cribado Neonatal, y por tanto sin sospecha clínica, y los otros dos fueron referidos desde los servicios de pediatría y neurología de los hospitales San Cecilio (Granada) y Sant Joan de Deu (Barcelona), con alteraciones de comportamiento de tipo autista y retraso estatura-ponderal.

Los datos obtenidos parecían indicar tres patrones bioquímicos diferentes, resumidos en la **tabla 11**:

- a) Un perfil bioquímico compatible con una forma variante de Jarabe de Arce, esto es, incrementos moderados en los niveles de aminoácidos ramificados -leucina, valina e isoleucina- (BCAAs) y de sus correspondientes α -cetoácidos (BCKAs) en plasma y orina, en el paciente PP2Cm
- b) El de los pacientes BCKDK_1 y BCKDK_2, con disminuciones en BCAAs y sus correspondientes BCKAs en fluidos corporales, siempre comparados con los detectados en una muestra de individuos control de edades similares. El perfil metabólico de estos pacientes se asemejaría a un “anti-MSUD”, con disminución de metabolitos en lugar de acumulación tóxica.
- c) El del paciente BCATm, con incrementos moderados de BCAAs, pero con valores normales de BCKAs.

Tabla 11_ Metabolitos y sintomatología clínica al diagnóstico de los pacientes incluidos en el estudio:

Paciente	BCAA en plasma (μmol/L)			BCKA en plasma (μmol/L)		BCAA en LCR (μmol/L)		BCAA en orina (mmol/mol creatina)	
	Leu	Ile	Val	α-KIC	α-KMV	Leu	Ile	α-KIC	α-KMV
	n = 109 ± 31	n = 54 ± 16	n = 212 ± 53	n = 11 - 57	n = 3 - 5	n = 10,9 ± 2,9	n = 4 ± 1,2	n = 7,7 ± 5,7	n = 3 ± 1,5
									n = 9,5 ± 5,3
P. PP2Cm	471	218	448	143	43	38			
P.BCKDK_1	12 - 17	4 - 14	43 - 85	2	2	2	0	0 - 2	
P.BCKDK_2	28.7 - 48.8	10,5 - 24,6	70 - 151	5 - 8	4 - 5	10 - 32	0,8 - 1,3	1,6 - 2,3	1,5 - 1,7
									3,1 - 3,3
P.BCATm	325	248	606	56	104	30		27	20
									41
Paciente	Año nacimiento	Sospecha	Sexo	Historia familiar	Observaciones clínicas relevantes				
P. PP2Cm	1990	Cribado neonatal	M	Padres caucásicos no consanguíneos	Nunca ha tenido episodios de descompensación metabólica.No tiene síntomas cardíacos ni retraso mental. Bajo tratamiento de restricción dietética de BCAAs desde el diagnóstico bioquímico. En la actualidad lleva una vida normal y autónoma.				
P.BCKDK_1	2007	Retraso desarrollo	V	Padres árabes consanguíneos	Síntomas de retraso en el desarrollo desde el primer mes de vida y anomalías en el comportamiento compatibles con el espectro autista. Sin epilepsia pero muestra picos multifocales en EEG a los 4 años.				
P.BCKDK_2	2007	Retraso desarrollo	V	Padres caucásicos no consanguíneos	Retraso psicomotor desde el primer mes de vida y anormalidades en el comportamiento enmarcadas en el espectro autista. Sin epilepsia pero muestra picos multifocales en EEG a los cinco años.				
P.BCATm	2014	Cribado neonatal	M	Padres caucásicos no consanguíneos	Bajo tratamiento desde el día 21 de vida, con poca lactancia materna y suplementación con fórmula. Evolución muy favorable, sin sintomatología clínica aparente.				

2|

Análisis genético: búsqueda y caracterización de los eventos causantes de patología

61

Aunque la metodología empleada para el análisis genético en cada caso ha variado en función del estado del arte del momento, desde el *array* de genotipado y posterior secuenciación de Sanger de genes candidatos empleada para identificar las mutaciones en el paciente PP2Cm, a la secuenciación masiva paralela, clave para la detección de mutaciones en el gen *BCAT2*, el flujo de trabajo siempre ha sido similar. Todas las variantes identificadas se sometieron a un primer “filtro genético” que las certificaba como variantes ausentes en población control, bien mediante análisis preliminar de los cambios identificados utilizando paneles comerciales de DNA control procedentes de 300 individuos caucásicos sanos (secuenciación de Sanger o *High Resolution Melting*, HRM), y/o mediante un estudio bioinformático analizando la frecuencia de presentación alélica de la variante en bases de datos como dbSNPs, 1000 genomas, Exome Variant Server o ExAc browser. Posteriormente se analizó el patrón de segregación de las variantes alélicas con el fenotipo de patología, y por último se concluyó con un análisis funcional de las mutaciones identificadas, a fin de validar el nuevo gen propuesto como responsable del fenotipo del paciente.

2.1 | Deficiencia en la proteína fosfatasa PP2Cm

Tras completar la secuenciación de Sanger de las regiones codificantes e intrónicas flanqueantes de los genes conocidos hasta ese momento como potencialmente responsables de la forma variante de Jarabe de Arce –*BCKDHA*, *BCKDHB*, *DBT* y *DLD*–, y al no identificar mutaciones bialélicas en el DNA del paciente, el siguiente paso fue la evaluación de la ganancia o pérdida de contenido génico (CNVs) como causa de la patología.

A) Búsqueda de otros eventos genómicos: *array* de SNPs

El *array* de genotipado posibilita en un solo análisis no solo detectar cambios en el número de copia (CNVs, *Copy Number Variations*), sino localizar regiones con pérdida de heterocigosidad, y por tanto potenciales candidatas para contener genes y mutaciones responsables de patología con herencia autosómica recesiva.

El *array* de SNPs (Illumina 610-Quad Beadchip), realizado en el Centro de Genotipado Nacional (CEGEN), analizó 610.000 SNPs (Single Nucleotide Polimorfisms) bialélicos a lo largo de todos los

cromosomas del paciente, permitiendo así completar un análisis uniforme y detallado del número de copias (Log R) y de la heterocigosidad, medida como frecuencia del alelo B. El primer parámetro, el logaritmo del “ratio R”, proporciona un valor de la intensidad de cada SNP normalizado por el experimento, con lo que podrá tomar diferentes valores dependiendo del carácter de la variación en el número de copias detectada (duplicaciones, hemicigosis, deleciones). El estado de heterocigosidad, por otra parte, se calcula a partir de la frecuencia del “alelo B”. Una región con un patrón normal de heterocigosidad tendrá un promedio de frecuencia de alelo B de 0,5, esto es, una mayoría de genotipo AB (alelos materno y paterno en formas diferentes) para los SNPs analizados. Ante una pérdida de heterocigosidad, encontraremos la frecuencia de alelo B de 0 ó 1 para la región homocigota, esto es, todos los SNPs en la forma AA o BB.

Como se muestra en la **figura 6.a**, el valor de Log R era igual a 0 en todos los SNPs analizados, indicando con ello ausencia de variaciones en el número de copias en ninguna de las regiones cromosómicas analizadas. Esto nos permitió descartar la existencia de CNVs en los genes *BCKDHA*, *BCKDHB*, *DBT* y *DLD* como responsables de patología.

Por el contrario, si que se observó una pérdida completa de heterocigosidad en el cromosoma 4, como reflejaba la frecuencia del “alelo B”, igual a 0 ó 1 en todos los SNPs del cromosoma 4 (**fig. 6.b**). El patrón era AB para el resto de los cromosomas.

Mediante un análisis pormenorizado de los genes que, localizados en este cromosoma, pudieran estar relacionados con el metabolismo de los BCAA, destacamos dos candidatos (**fig. 6.c**): el gen *LIAS*, en la región 4p14, que codifica para la proteína ácido lipóico sintetasa, involucrada en la síntesis de ácido lipóico, cofactor necesario del complejo BCKDH, y el gen *PPM1K*, que localizado en la región 4q22.1, codificaba para la proteína fosfatasa PP2Cm, propuesta meses antes como reguladora del complejo BCKDH en ratones (Lu, Sun et al. 2009).



63

Figura 6 _Array de SNPs en el cromosoma 4: Logaritmo del Ratio R y Frecuencia del alelo B. Los dos parámetros analizados fueron el logaritmo del ratio R (a) y la frecuencia del alelo B (b), mostrándose los resultados en el cromosoma 4. c) Los genes seleccionados para ulterior análisis, *LIAS* y *PPM1K*, se encuentran en las regiones 4p14 y 4q22.1 respectivamente, como se señala en rojo, ampliándose el detalle de dichas regiones.

B) Identificación de mutaciones en el gen *PPM1K*

Aunque en base al fenotipo clínico y bioquímico esperado para un defecto en *LIAS* (Mayr, Zimmermann et al. 2011) era poco plausible que este fuese el gen responsable, se descartó como gen candidato tras secuenciar las regiones exónicas e intrónicas flanqueantes en el DNA de nuestro paciente.

La secuenciación del gen *PPM1K* permitió identificar en homocigosis una delección de dos pares de bases: c.417_418delTA en el exón 2 del gen (fig. 7). El cambio, no descrito anteriormente, estaba ausente en los 300 alelos control también secuenciados.

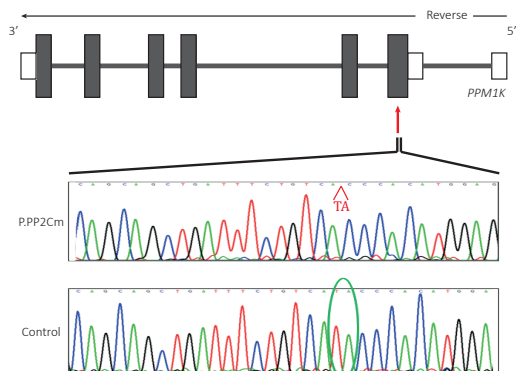


Figura 7_Secuenciación por Sanger del gen *PPM1K* humano: Representación esquemática del gen *PPM1K* humano (cajas negras: exones codificantes, cajas blancas: exones no codificantes, cintas: intrones), y fragmento del cromatograma de la secuenciación de Sanger en el que se observa la delección de dos pares de bases (panel superior) que se encontró en el exón 2 del paciente PP2Cm, frente a una secuencia control (panel inferior).

B.1) Patrón de herencia discordante compatible con una posible isodisomía uniparental

Para confirmar el patrón de herencia de la mutación se analizó la presencia de la variante en muestras de DNA genómico de los padres, como se muestra en la **figura 8**. El análisis mutacional confirmaba la presencia en heterocigosis de la mutación c.417_418delTA en el DNA genómico paterno, mientras que, por el contrario, la madre mostraba un genotipo wt en ambos alelos.

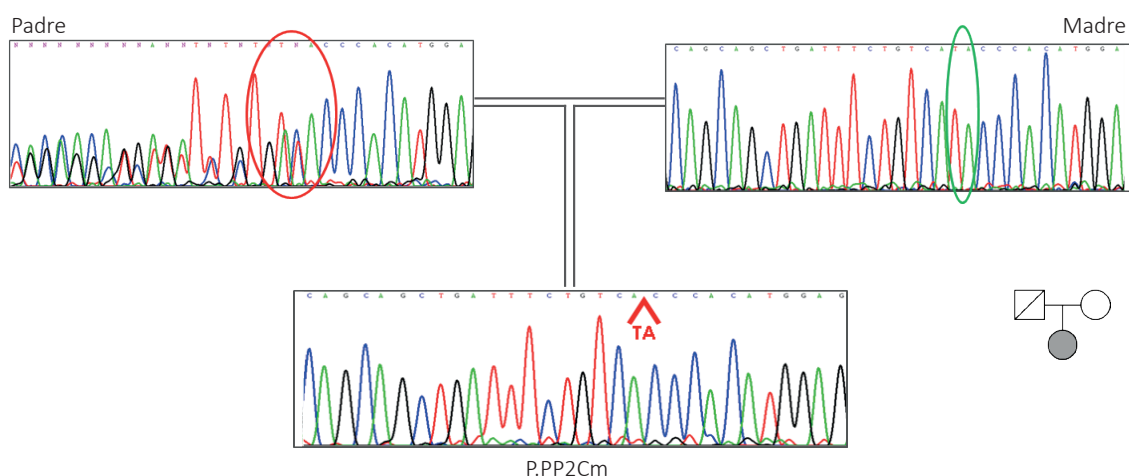


Figura 8_Análisis del patrón de segregación de la mutación *PPM1K* c.417_418delTA: Secuenciación del gen *PPM1K* en el DNA genómico de ambos progenitores del paciente. La presencia de dobles picos en el DNA del padre se debe a la mezcla de la secuencia de ambos alelos, encontrándose la mutación en heterocigosis.

La pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 4 unido al patrón de herencia discordante era compatible con una posible isodisomía uniparental (UPD, *Uniparental Disomy*) completa del cromosoma 4 sin variaciones en el número de copia. En esta situación el caso índice portaría dos copias del cromosoma paterno con la mutación en el gen *PPM1K*, y ninguna del cromosoma materno. Según estos datos, la mutación *PPM1K* c.417_418delTA tendría un patrón de herencia autosómico

recesivo, no presentándose patología en el padre (portador heterocigoto de la mutación) y si en el paciente (homocigoto). Se requerirán análisis detallados que permitan completar el estudio.

B.2) Análisis funcional del cambio PPM1K c.417_418delTA

A nivel de mRNA

65

Como se resume en la **figura 9**, la delección de dos pares de bases produciría un cambio en la fase de lectura del cDNA, cuyo efecto predecible sería la generación de un codón de parada prematura, p.Thr140Profs*12, que podría disparar la actuación del sistema de vigilancia de la calidad del mRNA -NMD, *Nonsense Mediated Decay*- que detecta y degrada transcritos que contienen codones de parada prematura, evitando con ello la presencia en la célula de proteínas truncadas con efectos tóxicos. Por ello, primero realizamos un análisis genético mediante amplificación y secuenciación de la región codificante completa del gen *PPM1K* que nuevamente detectó la mutación c.417_418delTA en homocigosis, y posteriormente una cuantificación por qRT-PCR de los transcritos de *PPM1K* normalizados por la expresión de *GAPDH*, tanto en el paciente como en fibroblastos control. Los resultados indicaron que si bien la expresión del gen *PPM1K* era más reducida en fibroblastos del paciente ($\Delta Ct = 8,495 \pm 0,44$) que en controles ($\Delta Ct = 7,86 \pm 0,25$), no estaba totalmente deplecionada.

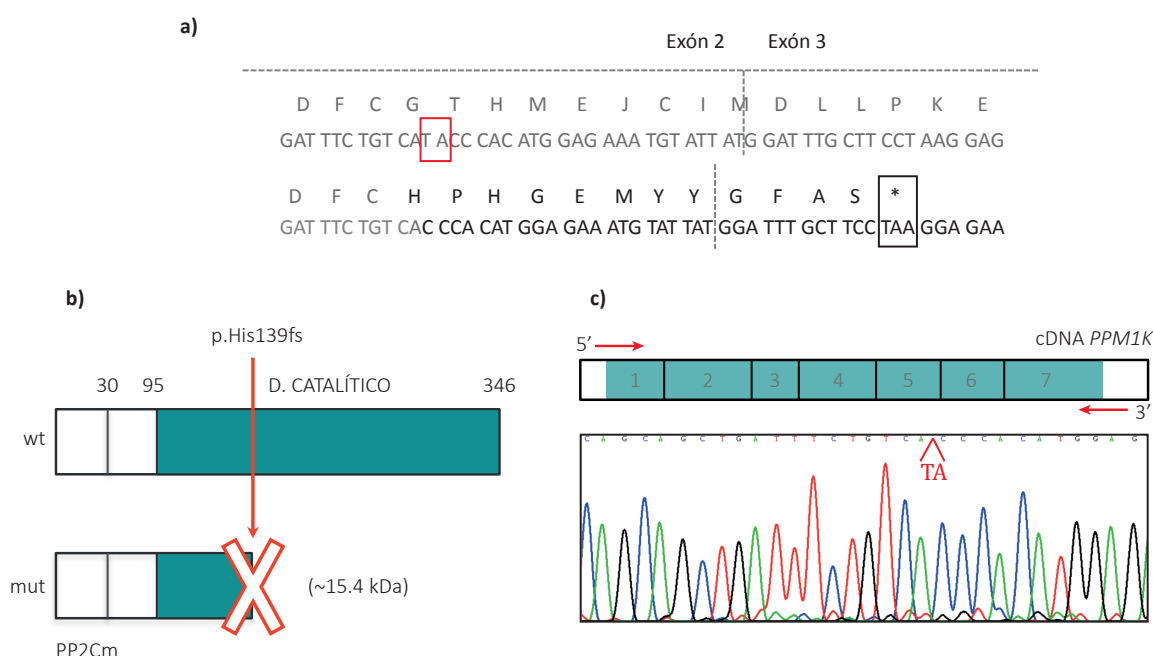


Figura 9_Predicción *in silico* del efecto de la mutación sobre el cDNA y la proteína: Análisis teórico del efecto de la delección de dos pares de bases sobre **a)** el cDNA y **b)** sobre la proteína. **c)** La secuenciación de todo el cDNA del gen *PPM1K* con oligonucleótidos específicos localizados en los extremos 5' y 3' de la región codificante (flechas rojas) confirmó la presencia de la mutación en homocigosis en el mRNA del paciente.

A nivel de proteína

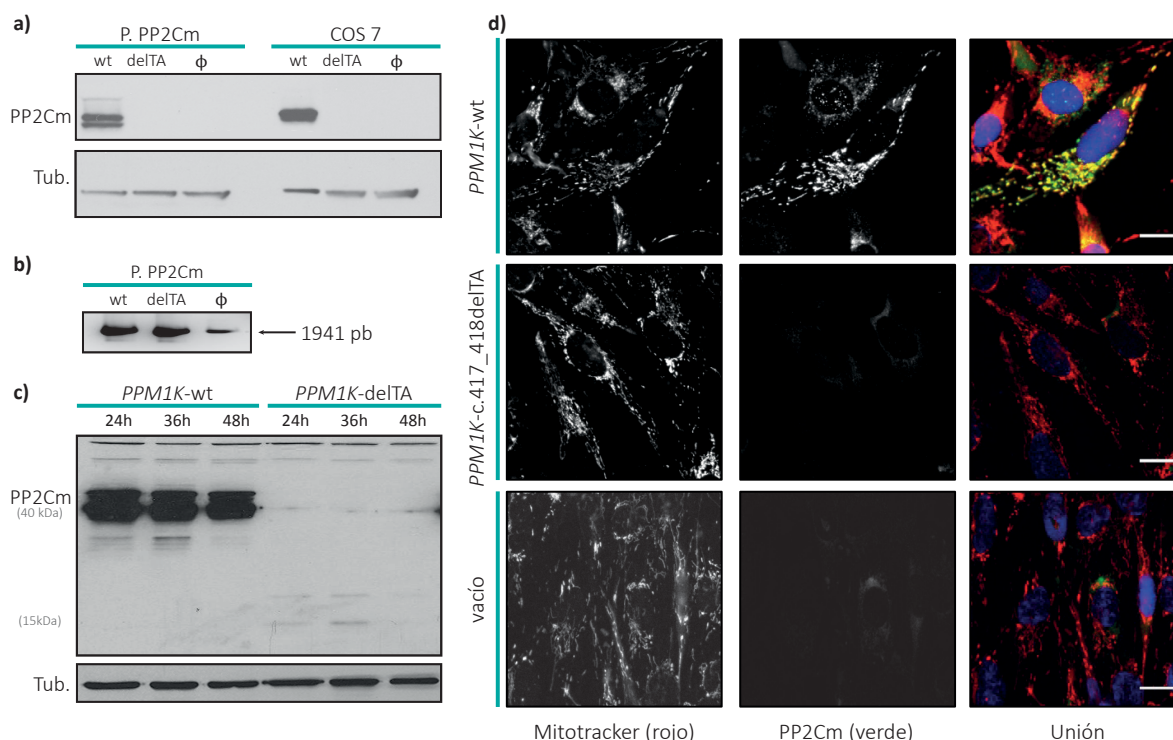
66

Comprobado que el efecto de la mutación no provocaba la eliminación del mRNA, se investigó su efecto sobre la producción de la proteína PP2Cm mediante análisis por Western blot. Los primeros ensayos dirigidos a la detección de la proteína PP2Cm endógena en fibroblastos control no permitieron su detección con ninguno de los anticuerpos comerciales utilizados (indicados en la sección de Materiales y Métodos). Por tanto, para demostrar el efecto de la mutación sobre la producción y/o estabilidad de la proteína fue preciso realizar una sobreexpresión de la misma mediante transfección transitoria de fibroblastos inmortalizados de la paciente con un plásmido comercial pT-REx conteniendo el gen *PPM1K* en su forma salvaje (pT-REx/*PPM1K*-wt) o tras recrear la mutación *PPM1K* c.417_418delTA mediante mutagénesis dirigida. Como control del efecto de la transfección se incluyó el plásmido vacío pT-Rex (ϕ). La transfección en el mismo experimento de células COS7 con las distintas construcciones facilitó la correcta caracterización de la proteína PP2Cm normal.

La expresión transitoria de las proteínas normal y mutante en los dos tipos celulares 36 h post-transfección rindió resultado similares: ausencia total de PP2Cm de tamaño normal tras la transfección del plásmido *PPM1K* c.417_418delTA y presencia de proteína normal (40,9 kDa) para la construcción *PPM1K*-wt (fig. 10.a).

Se discriminó entre un posible defecto en la expresión del mRNA *PPM1K* c.417_418delTA o una degradación rápida de la proteína mutada analizando la expresión de los transgenes *PPM1K* c.417_418delTA y *PPM1K*-wt en los fibroblastos humanos, mediante análisis de los mRNAs producidos utilizando *primers* diseñados para amplificar la región codificante completa del gen *PPM1K*. Los resultados obtenidos corroboraban la expresión estable del transgen *PPM1K* c.417_418delTA (fig. 10.b). Se analizó mediante Western blot en células COS7 la presencia de proteína normal y mutante a las 24, 36 y 48 horas post-transfección. A las 24 y 36 h se visualizaba en los carriles *PPM1K* c.417_418delTA una banda de menor tamaño (15kDa), que desaparecía por completo a las 48 h, y que no se detectaba en los carriles correspondientes a la transfección con la construcción wt (fig. 10.c). Con todo, los resultados sugerían que, si se sintetizaba, la proteína truncada era altamente inestable y se degradaba rápidamente.

Por último, se verificó la localización mitocondrial de la proteína sobreexpresada mediante análisis de inmunofluorescencia en fibroblastos deficientes en PP2Cm (fig. 10.d) y células COS7 (datos no mostrados). Previo a ello, se marcaron las mitocondrias con la sonda fluorescente MitoTracker™, que permite la visualización del orgánulo a una longitud de onda de 633 nm (canal rojo) con un microscopio de fluorescencia. Observamos en la figura 10 que únicamente al transfectar las células con la forma wt del gen *PPM1K* se detectaba proteína PP2Cm (visualizada en el canal verde, a λ 532nm, por el anticuerpo secundario utilizado), y que aparentemente co-localizaba con la sonda MitoTracker™, no detectándose la proteína endógena con el anticuerpo utilizado.



67

Figura 10_Valoración de la expresión de PP2Cm: **a)** Valoración de la expresión de la fosfatasa en fibroblastos del paciente y células COS7 mediante Western blot a 36h post-transfección: Se muestra un recorte representativo de un Western blot en el que se analizó la presencia o ausencia de proteína PP2Cm en tres supuestos: células transfectadas con pT-REx/*PPM1K*-wt (wt), células transfectadas con la forma mutada del gen, pT-REx/*PPM1K*-c.417_418delTA (delTA) y células transfectadas con el plásmido vacío (ϕ). Los resultados fueron normalizados por el control de carga Tubulina (Tub.). **b)** Expresión del transgen en fibroblastos del paciente PP2Cm tras la transfección con pT-REx conteniendo las distintas formas del gen *PPM1K* **c)** Análisis de la presencia de proteína en las formas wild-type o mutada a 24, 36 y 48h post-transfección. La película ha sido sobreexpuesta para permitir visualizar una banda a la altura de 15 kDa de menos intensidad que el resto **d)** Representación de la localización subcelular de la proteína fosfatasa PP2Cm en fibroblastos del paciente PP2Cm: en la columna de la izquierda se muestran las imágenes obtenidas en la visualización del canal rojo, que corresponden a la sonda fluorescente Mitotracker™. En la columna central, las obtenidas en el canal verde, correspondientes al anticuerpo anti-PP2Cm. En la tercera columna, la superposición de ambas imágenes, con los núcleos teñidos con DAPI (azul). 63x magnificaciones en microcopio de fluorescencia. Barra de escala blanca = 20 µm.

C) Validación del gen *PPM1K* como responsable de la patología

El impacto de la deficiencia en PP2Cm en la pérdida de funcionalidad del complejo BCKDH en la paciente se evaluó mediante determinación directa de la actividad descarboxilativa del complejo en ausencia y presencia de proteína PP2Cm normal.

La actividad del complejo deshidrogenasa se mide como la descarboxilación de leucina marcada con ^{14}C , registrada como la tasa de aparición de CO_2 radiactivo, corregida por la incorporación de leucina a proteínas como control metabólico del experimento. Los fibroblastos inmortalizados del paciente mostraron, en condiciones basales, una actividad descarboxilativa del complejo BCKDH de un 15,3%

respecto a la actividad promedio de los controles (fig. 11.a).

A fin de demostrar que era precisamente la falta de expresión de PP2Cm la responsable de la bajada en la actividad descarboxilativa se diseñó un experimento de rescate de la actividad BCKDH en células del paciente. Para ello, se transfectaron sus fibroblastos inmortalizados con distintas concentraciones del plásmido pT-REx/*PPM1K*-wt en co-transfección con un plásmido pT-REx conteniendo la secuencia codificante de la proteína β -galactosidasa (pT-REx-LacZ) (fig. 11.c). Esta aproximación permitió, mediante la determinación paralela de la actividad β -gal, estandarizar los resultados por la eficiencia de transfección. Se registró un rescate máximo de la actividad de estos fibroblastos al transfectar con 1,5 μ g de pT-REx/*PPM1K*-wt, aumentando 2,1 veces sobre la actividad basal, tal y como se muestra en la figura 11.b. Este rescate de la actividad establece a PP2Cm como la fosfatasa reguladora del complejo BCKDH en humanos.

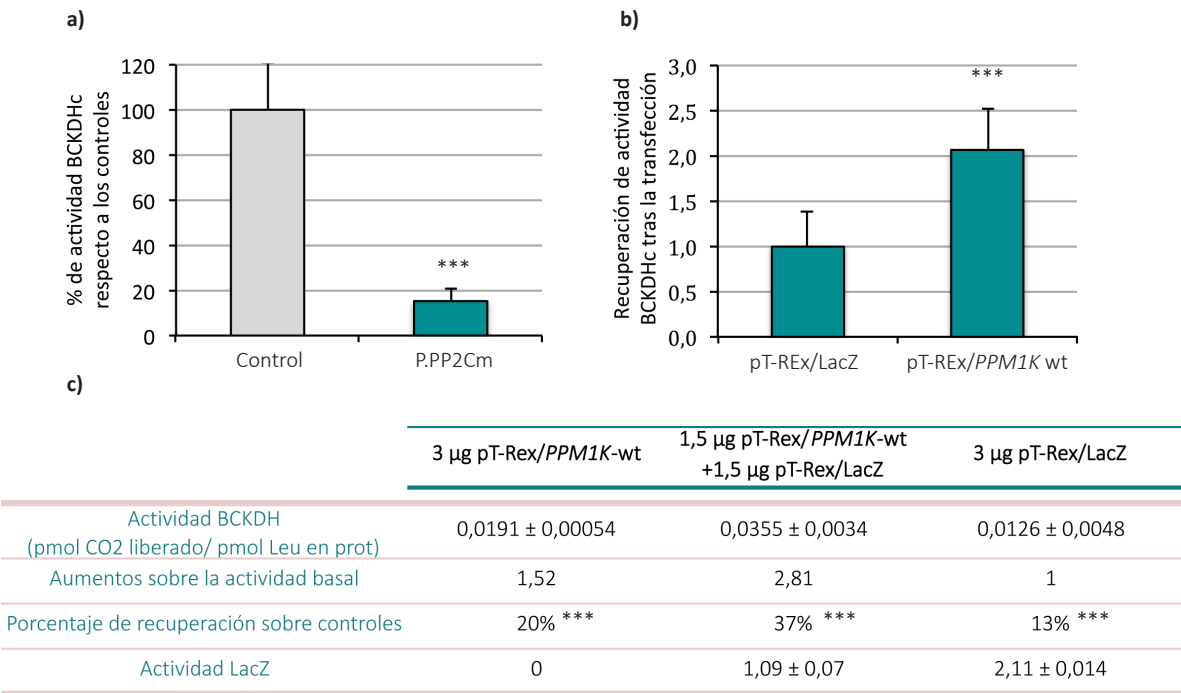


Figura 11_Medida de la actividad de BCKDH: La actividad BCKDH se valoró como descarboxilación de leucina marcada con ¹⁴C, registrando la aparición de ¹⁴CO₂. **a)** Medida de la actividad residual del paciente comparada con la registrada en fibroblastos control. **b)** Rescate de la actividad de BCKDH en el paciente PP2Cm tras la expresión transitoria de la proteína fosfatasa, expresada como aumento frente a la actividad basal en las mismas células, medida en la transfección con pT-REx/LacZ. **c)** Valores de la actividad en pmol CO₂ liberado corregido por pmol de leucina incorporada a proteína, y actividad β galactosidasa, utilizada para normalizar los experimentos. Los resultados presentados son el promedio de al menos n=3 experimentos por triplicado, y las barras de error muestran la desviación estándar de los mismos. El análisis estadístico es una prueba T de Student (***) p-valor < 0.001).

2.2 | Pacientes con alteraciones de comportamiento tipo autista: deficiencia en la proteína BCKD quinasa

Los pacientes BCKDK_1 y BCKDK_2 (ver tabla 11), además de su comportamiento autista, tenían una identidad metabólica distintiva: una disminución en los niveles de BCAAs y sus correspondientes BCKAs en fluidos fisiológicos. Esta disminución de metabolitos podría ser el reflejo de un transporte deficiente de dichos aminoácidos al interior celular, o un incremento en su tasa catabólica, posiblemente reflejo de una hiperactividad descarboxilativa del complejo BCKDH.

A) Firma metabólica compatible con hiperactividad del complejo BCKDH

A fin de determinar si la disminución de las concentraciones de BCAAs era el producto de un metabolismo acelerado de estos aminoácidos, se realizó un marcaje con isótopos estables de las células en cultivo (fibroblastos de pacientes y de controles sanos) que nos permitió realizar la detección cuantitativa del metabolito marcado, y por tanto determinar su origen exacto. Así, tras 24 h de incubación de las células en medio MEM libre de BCAAs y suplementado con 0,8 mmol/L de [U-¹³C] Leucina, se analizó la presencia de [U-¹³C] α -cetoisocaprónico, producto de la descarboxilación oxidativa de la leucina, en el medio de cultivo. Tal y como se muestra en la **figura 12**, se observó una reducción en la concentración de [U-¹³C] α -cetoisocaprónico de un 50% en el medio de cultivo de los pacientes respecto al medido en los fibroblastos control.

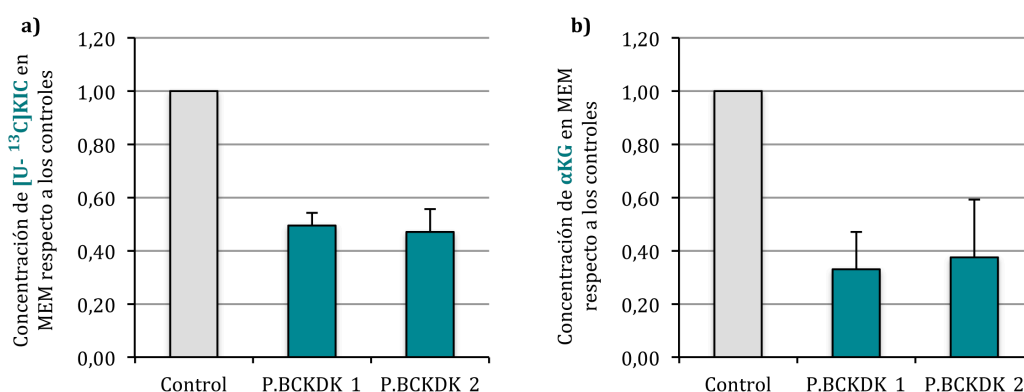


Figura 12 Estudio metabolómico del medio de cultivo de fibroblastos de pacientes BCKDK mediante HPLC-MS/MS: **a)** Se valoró la aparición de [U-¹³C]KIC en medio extracelular tras la incubación de los fibroblastos durante 24h con [U-¹³C]Leu. **b)** En paralelo se estudió la concentración de α KG en el mismo medio. Resultados expresados como decremento frente a los valores registrados en fibroblastos control. Los resultados presentados son el promedio de n= 2 experimentos por triplicado, y las barras de error muestran la desviación estándar de los mismos.

Se determinó así que las disminuciones detectadas en los niveles de BCAAs y BCKAs en ambos pacientes eran probablemente el reflejo de una activación constitutiva del complejo BCKDH.

La determinación paralela de la concentración de α -cetoglutarato en dicho medio mostró asimismo una disminución de más de un 50% en la concentración de α KG en el medio de cultivo de ambas líneas de fibroblastos de pacientes, siempre comparados con los datos obtenidos en fibroblastos control crecidos en las mismas condiciones.

70

B) Identificación de mutaciones en el gen *BCKDK*

En la identificación del defecto genético que subyacía en esta patología se utilizaron dos aproximaciones metodológicas diferentes: por una parte secuenciación masiva paralela del exoma completo del paciente P.BCKDK_1, seguido del filtrado de datos primarios con la plataforma bioinformática para enfermedades raras del CIBERER (BIER) y confirmación de los cambios identificados mediante secuenciación de Sanger; y por la otra, secuenciación directa de las regiones exónicas e intrónicas flanqueantes del gen *BCKDK* en el paciente P.BCKDK_2. En ambos casos se identificaron las variantes puntuales de secuencia en homocigosis, c.520C>G para el paciente BCKDK_1 y c.1166T>C para P.BCKDK_2 (fig. 13), con un efecto predecible sobre la proteína BCKDK de cambio aminoácido p.R174G y p.L389P respectivamente, clasificados como patogénicos por las plataformas de predicción bioinformática PolyPhen-2 y SIFT. Dichas variantes estaban ausentes en 300 alelos control analizados por secuenciación directa (c.520C>G) o mediante High Resolution Melting (HRM) (c.1166T>C), que permite la detección de mutaciones, polimorfismos, etc. mediante análisis en tiempo real de variaciones en las curvas de disociación de la PCR. En ambos casos se confirmó el patrón de herencia autosómico recesivo mediante análisis de DNA en muestras de los padres (datos no mostrados).

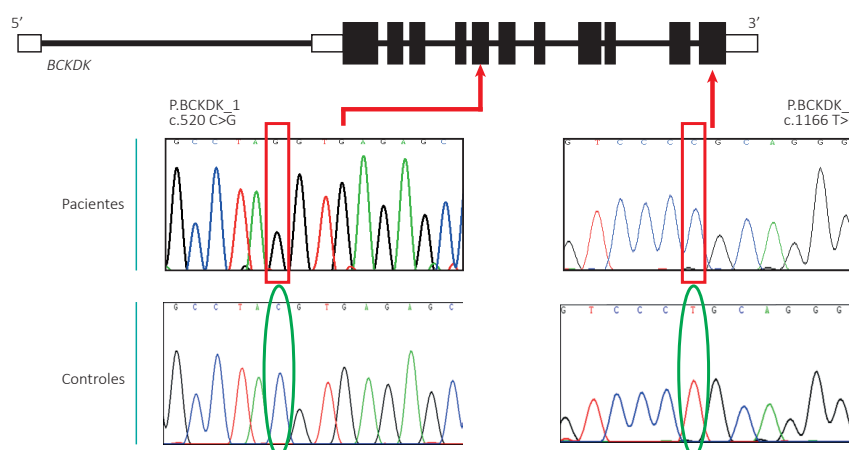


Figura 13_Secuenciación Sanger de los exones del gen *BCKDK*: Representación esquemática del gen *BCKDK* (cajas negras: exones codificantes, cajas blancas: exones no codificantes, cintas: intrones) y fragmento de la secuencia del DNA genómico de los pacientes BCKDK_1 y BCKDK_2 en los que se observan los cambios encontrados en los exones 6 y 12 respectivamente, marcados en rojo.

B.1) Estudio de la patogenicidad de los cambios *BCKDK* c.520C>G y *BCKDK* c.1166T>C

A nivel de mRNA

El estudio a nivel de mRNA, sin embargo, mostró resultados discrepantes con la predicción inicial para el mutante c.520C>G, como se muestra en la **figura 14**. La RT-PCR y posterior secuenciación del único transcrito identificado mostró una delección de 23 pares de bases, resultado de la generación de un nuevo sitio 5' donador de *splicing* dentro del exón 6. El producto de este transcrito aberrante, r.[520c>g; 521_543del], si se tradujese, provocaría un cambio en la fase de lectura y la aparición de un codón de parada prematura (p. R174Gfs1*). El estudio *in silico* mediante la plataforma *Fruitfly* del cambio puntual constató la previsible generación de un sitio de *splicing* alternativo dentro del exón 6 con un *score* de 0,96, muy superior a los 0,56 puntos predichos para el sitio 5' donador de *splicing* normal.

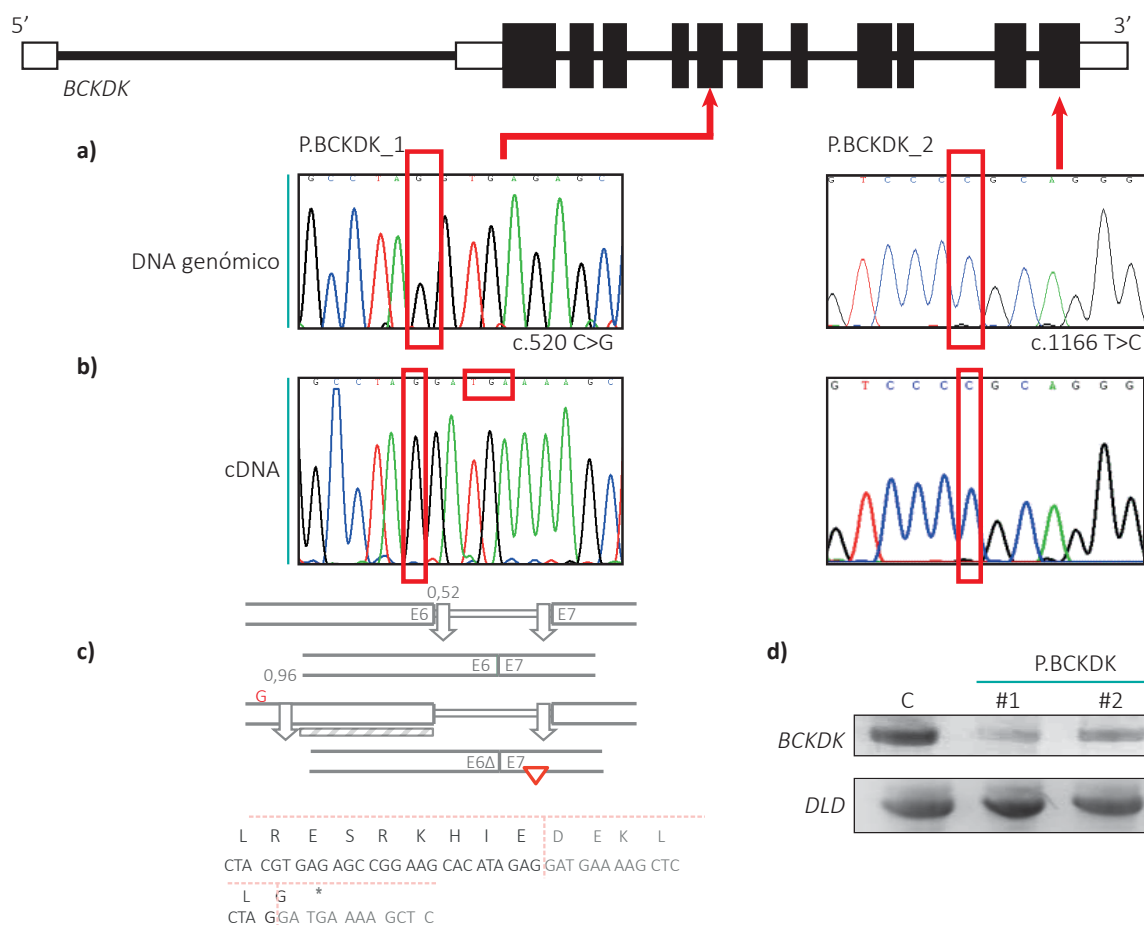


Figura 14_ Análisis del mRNA de los pacientes BCKDK mediante secuenciación de Sanger de su cDNA: Comparación del cDNA (**b**) de los pacientes BCKDK con el DNA genómico (**a**) observándose que la mutación en el primer paciente produce un splicing alternativo que implica un cambio en la fase de lectura y aparición de un codón TGA de parada prematura. **c**) Esquema del efecto de la mutación en P.BCKDK_1 sobre el splicing y predicción teórica del impacto sobre la proteína. **d**) Análisis del gen *BCKDK* por RT-PCR en ambos pacientes BCKDK y un control, normalizado por la expresión de *DLD*.

La cuantificación mediante qRT-PCR del mRNA *BCKDK* en las células de los pacientes confirmó una disminución drástica en la expresión del BCKDK r. [520C>G; 521_543del] ($\Delta C_t = 7,41$, frente a los controles, de $\Delta C_t = 4,58$), posiblemente reflejo de la activación del sistema NMD, que elimina transcritos con paradas prematuras.

72

A nivel de proteína

Para investigar el efecto de las mutaciones BCKDK p.R174Gfs1* y BCKDK p.L389P sobre la expresión de la proteína se analizó la presencia o ausencia de proteína endógena, primero confirmando su localización mitocondrial mediante inmunofluorescencia en células pre-teñidas con la sonda MitoTracker™, y analizando después mediante Western blot la presencia o ausencia de BCKDK en extractos mitocondriales de fibroblastos control y de los pacientes. La microscopía de fluorescencia (fig. 15.a) confirmó la presencia de proteína BCKDK en mitocondrias de fibroblastos control y ausencia total de la misma en los fibroblastos de los pacientes P.BCKDK_1 y P.BCKDK_2. En el análisis de Western blot también fue posible detectar proteína endógena en individuos control, mientras que tal como refleja la figura 15.b, se observaba una ausencia total de BCKDK en las mitocondrias de P.BCKDK_1, y un producto muy disminuido pero detectable para P. BCKDK_2.

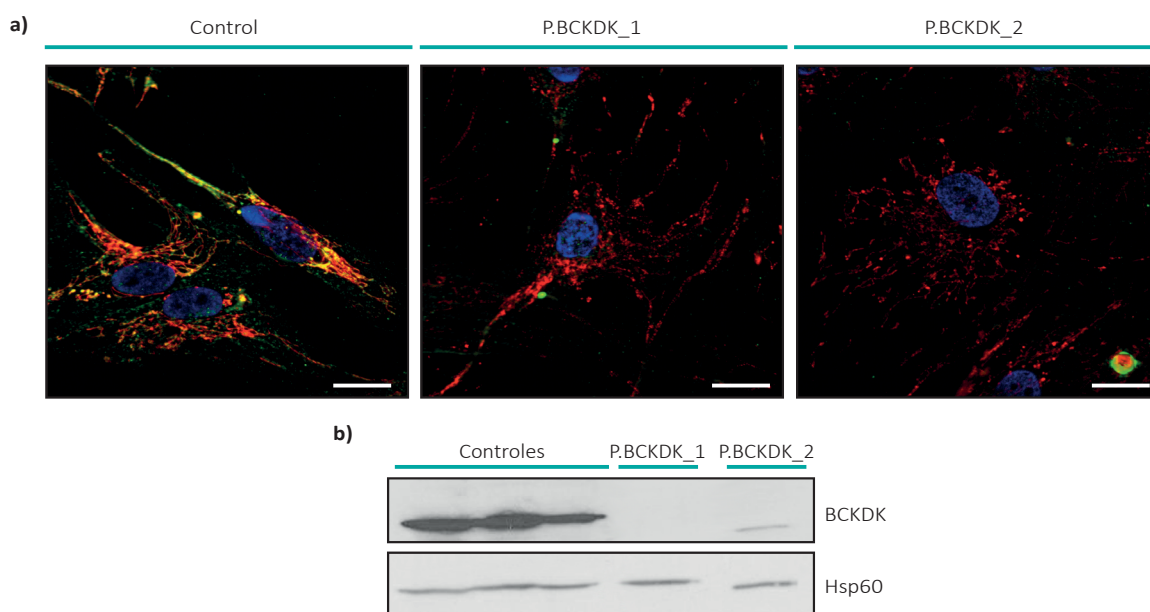


Figura 15_Detección de la proteína BCKDK por inmunocitoquímica y Western blot: Se detectó la proteína BCKDK en fibroblastos control y en células de los pacientes por inmunocitoquímica a 63 magnificaciones **(a)** en células previamente marcadas con la sonda Mitotracker™. En la imagen, se marcan en rojo las mitocondrias, y en verde la proteína BCKDK, resultando así un color amarillo cuando la expresión de la proteína co-localiza con la mitocondria. Los núcleos, teñidos con DAPI, se muestran en azul. Barra de escala blanca = 20 μ m. **b)** Western blot para BCKDK de la fracción mitocondrial de los fibroblastos aislada. Los valores fueron normalizados por la expresión de la chaperona mitocondrial Hsp60.

C) Validación del gen *BCKDK* como responsable de la patología

Las consecuencias funcionales de las mutaciones se abordaron mediante análisis directo del patrón de fosforilación del residuo Ser293 de la subunidad E1 α del complejo BCKDH en extractos mitocondriales obtenidos a partir de fibroblastos inmortalizados.

73

Para estudiar un posible rescate del patrón normal de fosforilación de BCKDH fue preciso primero generar una población uniforme de células de pacientes con expresión estable del transgen *BCKDK* wt mediante transducción lentiviral del plásmido pEZ-Lv205, que co-expresa BCKDK y eGFP como reportero (eGFP-BCKDK wt), permitiendo así la selección por citometría de flujo de poblaciones celulares con más del 95% de células infectadas (fig. 16.b).

Una vez seleccionada la población celular que expresaba el transgen *BCKDK* wt, se analizó por inmunofluorescencia la expresión y localización de la proteína BCKDK. Tal y como se muestra en la figura 16.c, la infección con el plásmido conteniendo el gen *BCKDK* normal permitía detectar la proteína en las mitocondrias de los pacientes. Finalmente, se comprobó la recuperación de la correcta fosforilación del residuo Ser293 de la subunidad E1 α de BCKDH, mediante análisis de Western blot en extractos de mitocondrias de pacientes transducidos o no con *BCKDK* wt (fig. 16.d). La infección con la forma *BCKDK* wt recuperaba los niveles de producción de la misma a niveles registrados en fibroblastos control y la concomitante recuperación en la fosforilación de la subunidad E1 α de BCKDH. La especificidad de reconocimiento del epitopo fosfo-Ser293 por el anticuerpo comercial utilizado, se había evaluado previamente mediante incubación del mismo en presencia o ausencia de un péptido específico para el bloqueo de dicho epitopo (Material y Métodos, figura 4).

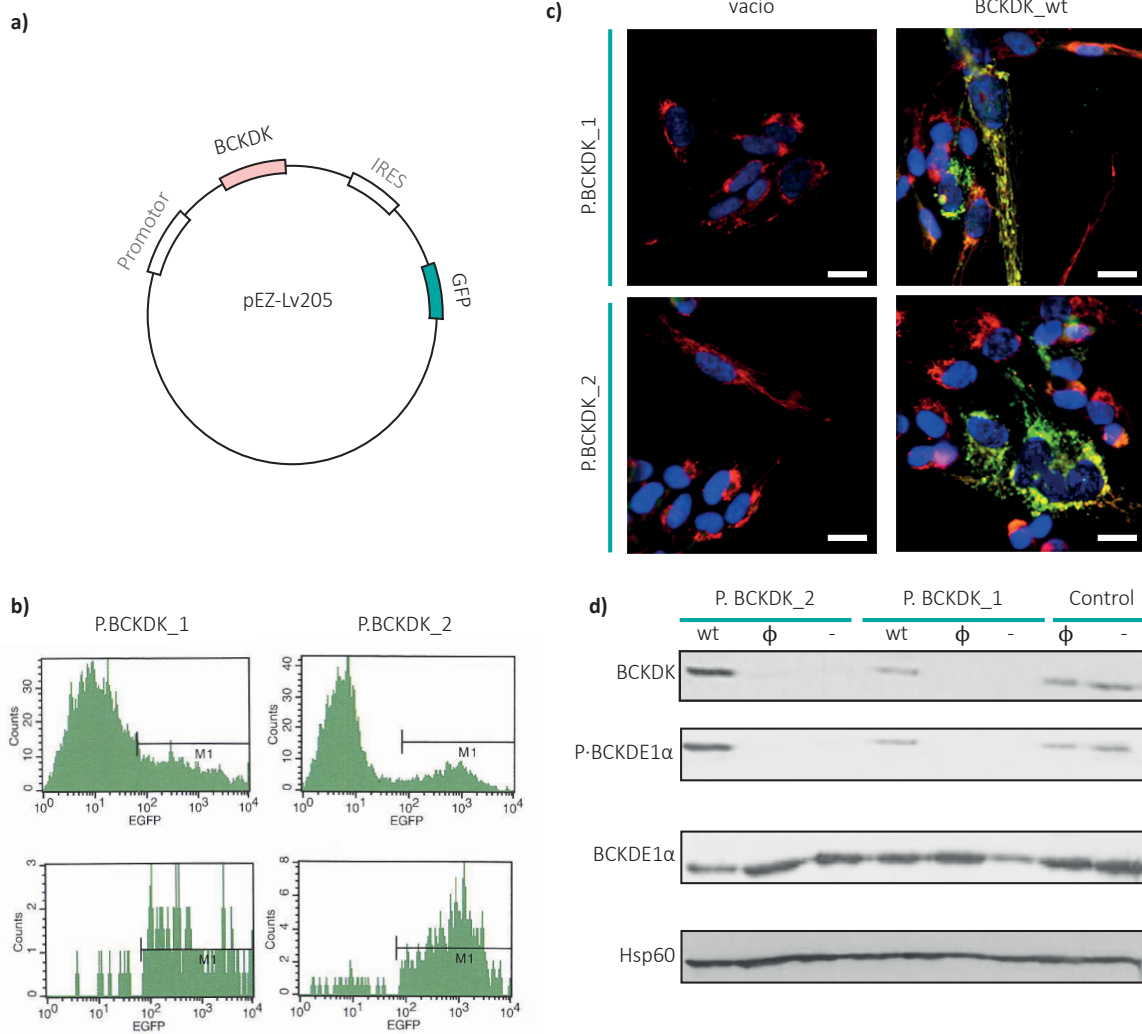


Figura 16 Recuperación de la fosforilación normal de BCKDH en fibroblastos de paciente mediante la expresión transitoria de BCKDK: **a)** Esquema del vector utilizado para la co-expresión estable de BCKDK y eGFP en líneas de fibroblastos de pacientes BCKDK **b)** Distribución de la población celular antes (panel superior) y después de la selección de la población M1, GFP positivas, mediante citometría (panel inferior). **c)** Comprobamos el éxito en la expresión transitoria de *BCKDK* en células de los pacientes mediante inmunocitoquímica, visualizada a 63 magnificaciones por microscopía de fluorescencia. En la imagen, se marcan en rojo las mitocondrias, y en verde la proteína BCKDK, resultando así un color amarillo cuando la expresión de la proteína co-localiza con la mitocondria. Se tiñeron los núcleos con DAPI, mostrándose en azul. Barra de escala blanca = 20 μ m. **d)** Análisis por western blot de la expresión de BCKDK tras la transfección con el plásmido pEZ-Lv205, conteniendo la forma *BCKDK*-wt (wt), el plásmido vacío (ϕ) o sin transfectar (-), en fracción proteica total de fibroblastos de pacientes BCKDK_1 y BCKDK_2, así como controles.

2.3 | Deficiencia en la proteína transaminasa BCATm

El aumento de BCAA sin variaciones significativas en los niveles de BCKAs encontrado en el paciente BCATm se alejaba del perfil de metabolitos de MSUD, en cualquiera de sus presentaciones, aunque si hacía sospechar de un defecto en alguna enzima implicada en el catabolismo de los aminoácidos ramificados.

A) Búsqueda de cambios candidatos mediante secuenciación de nueva generación

En este caso, para la identificación de gen responsable se utilizó la secuenciación masiva paralela utilizando el panel de exoma clínico TruSight™ One, que permite la captura de 4.813 genes asociados a un fenotipo clínico en humanos. Las más de 8400 variantes de secuencia identificadas en nuestro paciente se analizaron utilizando el *software* de VariantStudio Data Analysis de Illumina. Para la priorización de genes candidatos se utilizó un flujo de trabajo que, atendiendo a las características específicas que se les supone a las enfermedades minoritarias, primero eliminaba todos aquellos cambios registrados en otros pacientes secuenciados en el mismo ensayo, para posteriormente restringir la selección a aquellos que aparecían sobre dos alelos y con frecuencias alélicas en la población general inferiores al 0,05%. Con esto, nuestra lista quedó reducida a 460 cambios que filtramos atendiendo al carácter patogénico de los cambios y utilizando dos tipos de paneles virtuales, uno que incluía todos los genes conocidos implicados en el metabolismo de los aminoácidos ramificados; otro basado en la MitoCarta, una base de datos de genes nucleares que codifican para proteínas de expresión mitocondrial. Con el primero únicamente encontramos una mutación en homocigosis en el gen *BCAT2*, mientras que en el segundo caso obtuvimos 20 cambios posibles, entre los que destacaba precisamente el cambio c.1154_1160delCCCACGAinsTGGATGCCCTCT detectado en homocigosis en el gen *BCAT2*. La secuenciación de Sanger en DNA del paciente y sus padres confirmó el patrón de herencia autosómico recesivo.

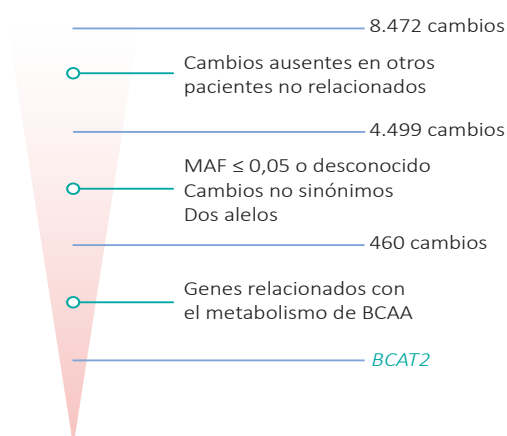


Figura 17_Filtrado de variantes obtenidas por NGS: Mediante los diferentes filtros aplicados se redujo el número de variantes a analizar, hasta llegar al cambio en *BCAT2*.

El gen *BCAT2* tiene 11 exones, y la delección de 7 pares de bases e inserción de 12 en homocigosis en el último exón, el cambio c.1154_1160delCCCACGAinsTGGATGCCCTCT provocaría un cambio en la fase de lectura del DNA, y aparición de un codón de terminación prematuro, que si se tradujese resultaría en una proteína truncada.

76

El análisis de segregación de la variante en el DNA genómico de los progenitores del paciente confirmaron un patón de herencia mendeliana, encontrándose en heterocigosis en cada padre.

B) Estudio de la patogenicidad del cambio *BCAT2* c.1154_1160del7ins11

Se investigó el efecto de la mutación sobre *BCAT2* mediante Western blot, en el que se comparó la presencia de ausencia de la proteína BCATm en fibroblastos del paciente, comparado con controles y otros pacientes con aumentos en los niveles de BCAAs (MSUD). Como se muestra en la **figura 18**, mientras que en proteína de fibroblastos control y MSUD detectábamos proteína BCATm, se registró una total ausencia de la misma en los fibroblastos del paciente.

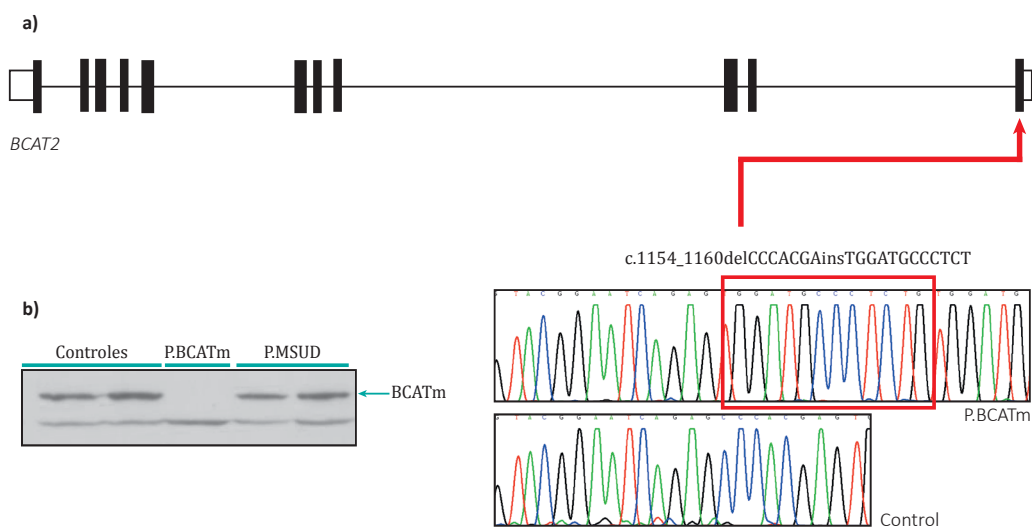


Figura 18_ Análisis de la mutación en *BCAT2* a nivel de DNA y proteína: a) Análisis del mRNA del paciente (panel superior), en el que se observa la inserción delección al compararlo con un control (panel inferior). **b)** Estudio del efecto de la mutación sobre la proteína, comparando con fibroblastos control y con dos pacientes MSUD

2.4 | Expresión de los genes del complejo BCKDH

Se ha descrito previamente que las subunidades del complejo BCKDH, en conjunto con la transaminasa mitocondrial, forman un macrocomplejo molecular o “metabolón” (Islam, Wallin et al. 2007). A este complejo, además, se unirían, dependiendo del estado energético y otros factores como las concentraciones de aminoácidos, las proteínas quinasa y fosfatasa anclándose a la subunidad E2 para ejercer la regulación sobre el catabolismo (Zhou, Lu et al. 2012).

Dado que las mutaciones descritas afectaban a la expresión de las proteínas reguladoras, se investigó mediante una RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) la expresión de las distintas subunidades del complejo en los distintos pacientes incluidos en el estudio.

Como se observa en la **figura 19**, la expresión de los genes de las distintas subunidades del complejo BCKDH variaba en función de la situación metabólica. Asociadas a las mutaciones en *PPM1K* observamos un aumento en la expresión de los genes de todas las subunidades, mientras que en los pacientes BCATm y BCKDK observamos una disminución de las subunidades similar y poco pronunciada, de donde se deduciría que esta no depende exclusiva ni directamente de las concentraciones de los aminoácidos ramificados. Además, la expresión de *PPM1K* está siempre disminuida, lo que situaría su expresión en una posición importante en la regulación del complejo

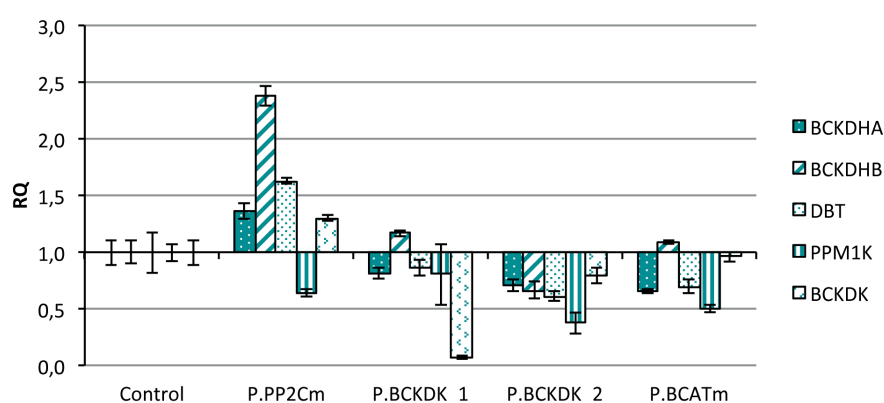


Figura 19_Cuantificación de transcritos de las subunidades del complejo BCKDH : Se cuantificaron los transcritos de los genes codificantes para las distintas subunidades del complejo BCKDH. Valores expresados como aumentos o decrementos sobre los registrados en controles.

3 | Identificación de vías responsables de patogenicidad: impacto de la desregulación del metabolismo de BCAA en la función mitocondrial

79

En esta segunda parte del trabajo hemos aprovechado la ventaja que nos proporcionan las enfermedades monogénicas descritas de disponer de modelos naturales en los que explorar el papel de los BCAAs y sus metabolitos inmediatos sobre aspectos concretos de la función celular. Y puesto que la función del complejo BCKDH no solo impacta directamente sobre el metabolismo energético, sino que también contribuye al suministro de importantes sensores celulares como el acetil-CoA (Green, Galluzzi et al., 2014), nuestro primer objetivo ha sido analizar la repercusión de la desregulación -tanto positiva como negativa- del complejo sobre la función mitocondrial.

3.1 | Desregulación del metabolismo de BCAA y función mitocondrial

Con el objeto de estudiar el efecto de la alteración en la regulación del metabolismo de los BCAAs en la función mitocondrial, analizamos dos aspectos interrelacionados de la misma: por una parte, se midió la generación de especies reactivas de oxígeno y la respuesta celular antioxidante, y por otra parte se analizó la función respiratoria, midiendo tanto la tasa de consumo de oxígeno a tiempo real en fibroblastos de pacientes en cultivo como el contenido de ATP de estas células.

A) Producción de anión superóxido y defensa antioxidante

Se ha descrito la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), derivadas de la producción de radical superóxido, como agente importante para la aparición del estrés oxidativo identificado en diferentes patologías neurológicas, incluidas algunas formas de autismo, o enfermedades metabólicas como el Jarabe de Arce (Mc Guire, Parikh et al. 2009). Por tanto, en primer lugar se valoraron posibles incrementos en las especies reactivas de oxígeno en las dos situaciones metabólicas aparentemente antagónicas descritas, la deficiencia en PP2Cm y los defectos en BCKDK.

Para ello se analizó la concentración de anión superóxido $O_2^{\cdot -}$ en los fibroblastos de pacientes y controles mediante citometría de flujo. Se utilizó la sonda MitoSOX, una sonda fluorogénica permeable dirigida específicamente a las mitocondrias, en las que se oxida rápidamente por efecto del anión superóxido.

Como se observa en la **figura 20.a**, para los tres pacientes con alteraciones en la regulación del catabolismo de los BCAAs se registraron incrementos estadísticamente significativos de $O_2^{\cdot -}$ sobre los niveles medidos en al menos tres líneas diferentes de fibroblastos control crecidos en las mismas condiciones. No obstante, fue en las células deficientes en BCKDK donde se constataron mayores diferencias, con aumentos de hasta 2,5 veces sobre los valores control, mientras que para PP2Cm los valores no superaron los 1,3 aumentos.

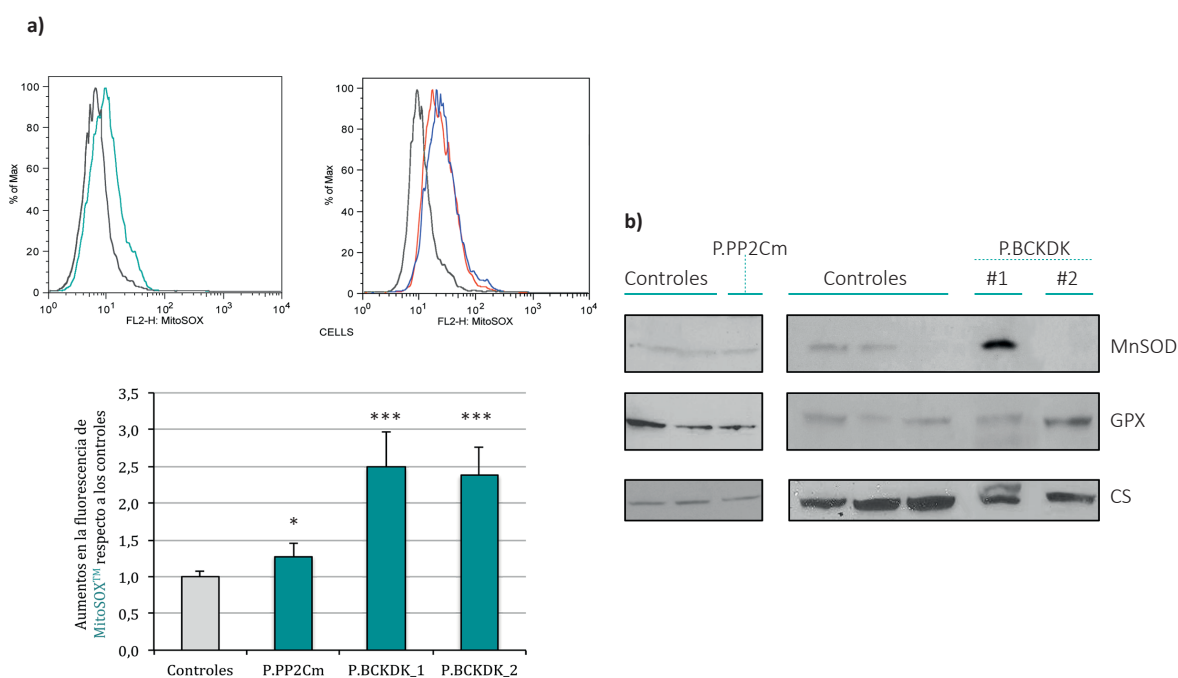


Figura 20_Valoración de la producción de anión superóxido y defensa antioxidante: **a)** Se midió la fluorescencia de la sonda mitocondrial MitoSOXTM mediante citometría de flujo, expresando los resultados como aumentos frente a los valores detectados en los mismos experimentos en controles. Los resultados mostrados son el promedio de al menos n=3 experimentos por triplicado, y los controles el promedio de n=3 controles. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). En el panel superior se muestran dos curvas ejemplo del análisis. Análisis estadístico T de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005) **b)** Western blot representativo de al menos n=3 experimentos hibridando con anticuerpos contra las enzimas antioxidantes manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y glutatión peroxidasa (GPX) en proteína total de los fibroblastos de controles y pacientes. Resultados normalizados por el control de carga citrato sintasa (CS).

Para evitar la acumulación tóxica de ROS, la célula está equipada con varios sistemas detoxificantes: en primera línea encontramos la superóxido dismutasa (MnSOD), que convierte el $O_2^{\cdot -}$ intramitocondrial en H_2O_2 , que posteriormente podrá ser eliminada por acción de, entre otras, la enzima glutatión peroxidasa (GPX). Si bien el H_2O_2 generado por el metabolismo del $O_2^{\cdot -}$ por la enzima MnSOD, no es una especie reactiva de oxígeno en sí, puede difundir fácilmente a través de las membranas y transformarse en radical hidroxilo en presencia de metales de transición. El análisis mediante western blot de ambas proteínas permitió hacer una primera evaluación de la capacidad de defensa antioxidante de los distintos fibroblastos frente a la producción del exceso de $O_2^{\cdot -}$.

Tal y como se muestra en la **figura 20.b**, solo se constató un incremento en superóxido dismutasa en los fibroblastos de P. BCKDK_1, mientras que tanto P. BCKDK_2 como en PPP2Cm presentaban valores similares a los detectados en controles. Por otra parte la cuantificación relativa de GPX no mostró variaciones significativas en ninguno de los fibroblastos analizados.

B) Respiración mitocondrial y síntesis de ATP

81

Puesto que un incremento significativo en las especies reactivas de oxígeno podría ser causa y/o consecuencia de una disfunción mitocondrial, se valoró tanto la función respiratoria como la síntesis de ATP celular.

Se monitorizó, utilizando el sistema Seahorse, la tasa de consumo de oxígeno (OCR) a tiempo real de fibroblastos en cultivo crecidos en condiciones estándar, y se evaluó su respuesta a la adición de diferentes drogas al medio de ensayo. Esto permitió el cálculo de parámetros bioenergéticos relevantes para las células como la respiración basal (OCR al principio del experimento), la respiración sensible a oligomicina u OSR (esto es, la fracción de ese consumo de oxígeno registrado en condiciones basales que está directamente comprometido en el acoplamiento del transporte de electrones con la actividad OXPHOS) y la respiración máxima o Rmax, medida tras adición de carbonil cianida-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), que desacopla el consumo de oxígeno de la síntesis de ATP, haciendo que la cadena transportadora de electrones funcione a su máxima capacidad.

De los datos obtenidos se desprendía que en las dos condiciones metabólicas analizadas, paciente PP2Cm y pacientes BCKDK, se detectaban caídas significativas tanto en la respiración basal como en la OSR. Dadas las reducciones de OSR de aproximadamente un 20% para los pacientes PP2Cm y BCKDK_1 y del 30% para BCKDK_2 (**fig. 21.a**), se midió la concentración de ATP en los fibroblastos. Consistentes con estos cambios, la concentración total de ATP celular también registraba disminuciones significativas en los tres casos, de un 40% para PP2Cm, y aún superiores para los fibroblastos de los pacientes BCKDK_1 y BCKDK_2, con defecto en la quinasa, tal y como se muestra en la **figura 21.b**. La inhibición de la glucólisis con 2'-desoxi-D-glucosa provocaba una disminución drástica de las concentraciones de ATP intracelular en todos los casos analizados.

Aun habiéndose detectado disminuciones en OSR y ATP total para los fibroblastos de los tres pacientes, su perfil respiratorio global era diferente. Mientras las células PP2Cm tenían una Rmax, que permite evaluar la capacidad de las mitocondrias para transportar y metabolizar los sustratos respiratorios, similar a la de las células control, los fibroblastos de los pacientes con defectos en BCKDK mostraban dos perfiles respiratorios claramente opuestos, con incrementos de la Rmax de 1,5 veces respecto a los valores controles para los fibroblastos del paciente BCKDK_1 y reducida a la mitad para BCKDK_2. Esto resulta en un perfil respiratorio general deprimido en P. BCKDK_2, mientras que en P.BCKDK_1 advertimos una alta capacidad de reserva de respiración mitocondrial (**fig. 21.d**)

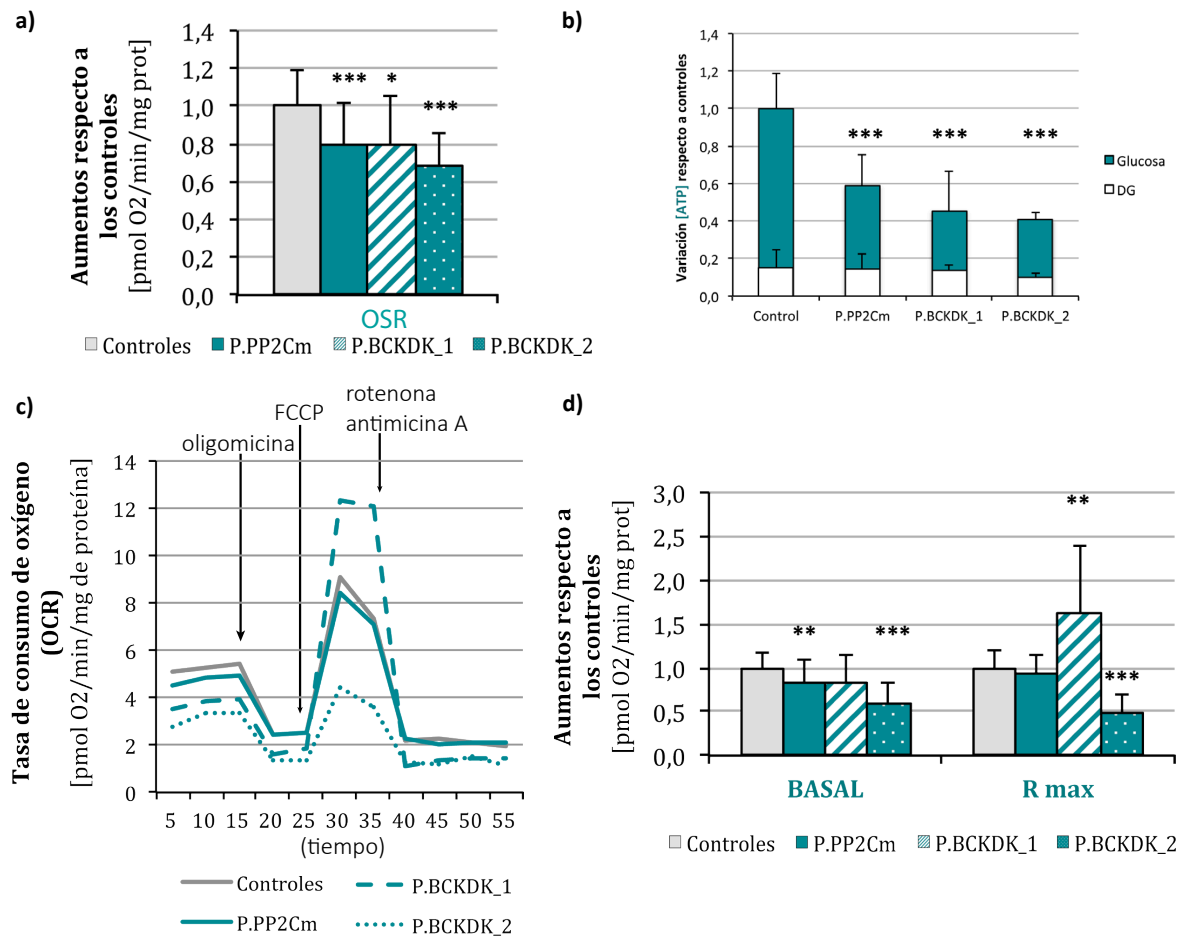


Figura 21_Evaluación de la función respiratoria mitocondrial en fibroblastos: perfil de consumo de oxígeno y medida de las concentraciones de ATP celular: Se valoró el perfil de consumo de oxígeno en fibroblastos control y fibroblastos de los pacientes PP2Cm y BCKDK en cultivo. **a)** Respiración sensible a oligomicina (OSR), medida como la disminución en la OCR tras la adición de oligomicina 6 μ M. **b)** Variación en la concentración de ATP medida en los fibroblastos de los pacientes respecto a los controles. Se comprobó la caída en el ATP tras la incubación de las células con 2-deoxy-D-glucosa 100mM **c)** perfiles promedio de todos los experimentos de consumo de oxígeno en controles y fibroblastos de pacientes **d)** aumentos o decrementos sobre los valores de los controles en las respiraciones basal y máxima. Todos los datos son el promedio de al menos n=3 experimentos por quintuplicado, y los controles mostrados el promedio de al menos 3 controles diferentes (experimentos de Seahorse) o 2 (medida de ATP); las barras de error representan la desviación estándar (SD). Análisis estadístico T de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005).

En el análisis de estos parámetros hemos encontrado que, lo que suponíamos como dos situaciones metabólicas antagónicas, tienen efectos no contrarios sobre la función respiratoria mitocondrial. Por tanto, el siguiente paso fue elucidar si el elemento central en la respiración mitocondrial era la variación en el flujo de BCAAs o las propias proteínas deficientes.

3.2 | Ausencia de fosfatasa PP2Cm: diferenciación entre el efecto de los metabolitos y de la proteína

83

Para la proteína fosfatasa se había propuesto en estudios anteriores al margen de los metabolitos una implicación preponderante sobre la función mitocondrial, por lo que se decidió explorar el papel aislado de esta proteína reguladora en la función celular.

A) Respiración mitocondrial y el papel de los BCAAs o BCKAs

Para valorar la contribución del incremento en los aminoácidos ramificados en la alteración de la función respiratoria, se midió la función respiratoria en dos pacientes de Jarabe de Arce que presentaban valores de aminoácidos ramificados al diagnóstico superiores a los del paciente PP2Cm (P.MSUD_1, con una forma clásica de la enfermedad) o similares (P.MSUD_2, con una forma variante) mediante el análisis del consumo de oxígeno a tiempo real en dichos fibroblastos.

Como se observa en la **figura 22**, el perfil respiratorio para ambas formas de MSUD nuevamente muestra variaciones con respecto al detectado en muestras control. Aunque en ambos casos se registraban disminuciones en las respiraciones basal y sensible a oligomicina, similares a las registradas para el paciente PP2Cm, estas eran más notables en el paciente variante. También aquí se registraron variaciones en la respiración máxima, disminuida en un 20% en el paciente con la forma variante de MSUD e incrementada 1,3 veces en los fibroblastos de la forma clásica. De los datos obtenidos se desprende una falta de relación clara o directa entre la deficiencia de actividad de BCKDH (y por tanto de los niveles de BCAAs y BCKAs intracelulares) y la disfunción respiratoria.

Para valorar el efecto aislado de los BCAAs se utilizó como modelo natural el cultivo de fibroblastos del paciente BCATm, con aumentos moderados en los aminoácidos ramificados pero valores normales en los cetoácidos.

Se registró una caída en la respiración mitocondrial en dichos fibroblastos comparado con los controles, con disminución en las respiraciones basal, máxima y sensible a la oligomicina, tal y como se relfaja en la **figura 22.b**.

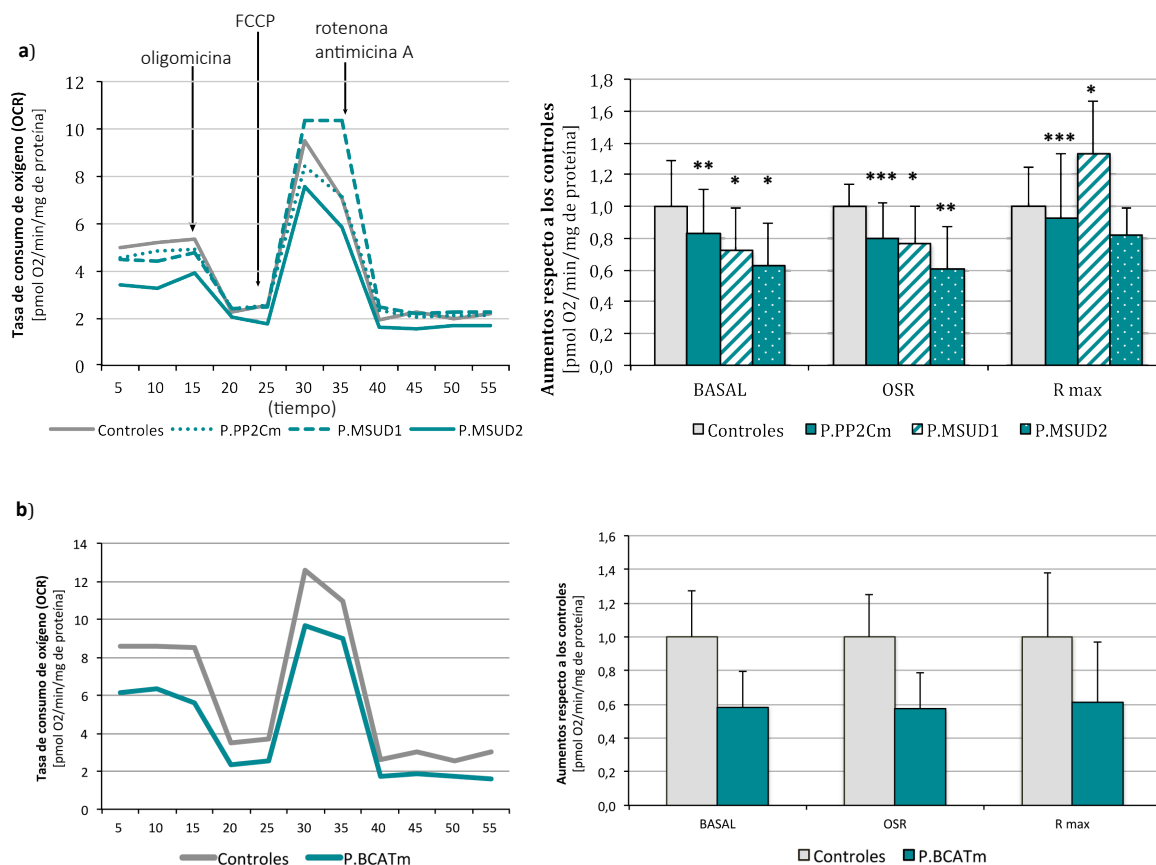


Figura 22_Evaluación de la función respiratoria mitocondrial en fibroblastos de otros pacientes con aumentos en los BCAAs y/o BCKAs: a) Se valoró el perfil de consumo de oxígeno en fibroblastos de dos pacientes de MSUD, con una forma clásica (P.MSUD_1) y variante (P.MSUD_2), comparados con controles y el paciente PP2Cm. En el panel derecho, perfiles generales de consumo de oxígeno en controles y fibroblastos de los pacientes MSUD; en el izquierdo, aumentos o decrementos sobre los valores de los controles en las respiraciones basal, sensible a oligomicina y máxima. Perfiles promedio de todos los experimentos realizados **b)** Estudio de la respiración en fibroblastos del paciente BCATm, en las mismas condiciones que en los pacientes MSUD. Todos los datos son el promedio de al menos n=3 experimentos por quintuplicado; y los valores de control el promedio de tres controles diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Análisis estadístico T de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005).

B) Formación del poro de transición mitocondrial

Se había propuesto a la proteína PP2Cm como implicada en la formación del poro de transición mitocondrial (Lu, Ren et al. 2007). Para comprobar si este aspecto también estaba alterado en fibroblastos del paciente, se valoró la capacidad de retención de calcio (CRC) de las mitocondrias del paciente PP2Cm, sirviendo como medida de la cantidad de Ca²⁺ necesario para disparar la formación del mPTP. Para ello se monitorizó la captación de calcio por las mitocondrias mediante el empleo de la sonda Calcium Green, que permite medir la concentración de calcio en el medio de ensayo. Se trataron células permeabilizadas en suspensión y en presencia de succinato 5 mM como sustrato respiratorio y ADP 5 μM con pulsos secuenciales de Ca²⁺ 20 μM, midiéndose la captación de calcio por

la mitocondria como una caída en la fluorescencia de la sonda. El momento de formación o apertura del mPTP se registró como un aumento sostenido en la fluorescencia, asociado a la liberación del Ca^{2+} mitocondrial.

Como resume la **figura 23 a-c**, los resultados obtenidos mostraban una alta variabilidad, probablemente asociada al estado de las células en el ensayo. En la figura se muestran dos experimentos, uno en el que se observan reducciones en el umbral de apertura del poro en las células PP2Cm, y otro en el que se obtuvieron valores similares a los controles. La incubación de los fibroblastos control con CsA 5 μM o ADP aumentaba la CRC de los mismos, (**figura 23.c**), lo que no siempre se observó en las células del paciente PP2Cm. Con estos resultados preliminares no se pudieron ni corroborar ni descartar alteraciones en el mPTP en los fibroblastos del paciente PP2Cm en las condiciones y tipo celular ensayados.

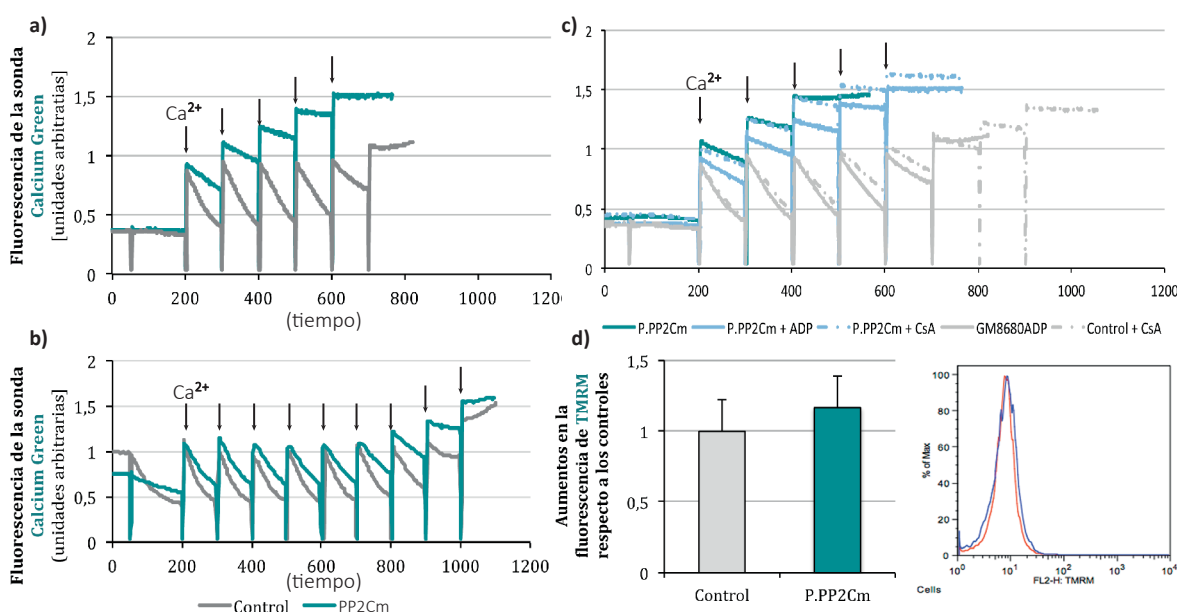


Figura 23_Apreciación de la sensibilidad a la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP) en fibroblastos del paciente PP2Cm: Se evaluó la capacidad de retención de calcio de las mitocondrias de fibroblastos del paciente P.PP2Cm y controles en células permeabilizadas mediante la adición de pulsos de Ca^{2+} 20 μM y medida de la disminución en la fluorescencia de la sonda Calcium Green. **a)** Comparación ejemplo de la CRC de fibroblastos control y de P.PP2Cm en la que los fibroblastos del paciente experimentan una disminución en la capacidad de retención de calcio. **b)** Comparación ejemplo en la que se observa el mismo comportamiento entre fibroblastos del control y del paciente P.PP2Cm **c)** Experimento en el que se observa cómo el tratamiento con ADP o Ciclosporina A (CsA) retrasa la formación del poro. **d)** Valoración del mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial en los fibroblastos del paciente PP2Cm frente a los valores observados en controles mediante la incubación con la sonda TMRM y posterior visualización en un citómetro de flujo. Los datos de la fluorescencia de TMRM son el promedio de al menos $n=3$ experimentos, y los controles el promedio de tres líneas control diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Análisis estadístico T de Student (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$).

Análisis del potencial de membrana mitocondrial

Cualquier perturbación en la formación del poro mitocondrial repercutirá sobre la polarización de la membrana plasmática. Así, se midió este parámetro con la sonda tetrametilrodamina metil ester (TMRM), un catión lipofílico que se retiene en la mitocondria en una proporción directa al diferencial de potencial de membrana. Tal y como se muestra en la **figura 23.d**, no se observó despolarización de la membrana mitocondrial en los fibroblastos del paciente P3 en las condiciones ensayadas.

86

C) PP2Cm y muerte celular: activación de las rutas de señalización proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y expresión de genes relacionados con la apoptosis

Los estudios previos sobre la fosfatasa PP2Cm relacionaron su ausencia con la activación de las rutas de señalización de las rutas MAPK, y la describían como esencial para el desarrollo y supervivencia celular en pez cebra (Lu, Ren et al. 2007).

Con esto, se analizaron por Western blot los niveles de proteínas p38, JNK y ERK fosforiladas en fibroblastos del paciente PP2Cm y de controles. Los resultados mostraron un incremento significativo en la fosforilación de p38 y JNK en las células de P.PP2Cm, pero no en los controles. No se observó ninguna variación en la activación de ERK.

Para profundizar en este análisis, se realizó un *array* de expresión de 84 genes relacionados con la apoptosis. En el análisis de los resultados, se consideraron las variaciones de expresión por encima del doble o por debajo de la mitad frente a los valores de la media de controles. En general, se observa un aumento en genes proapoptóticos como *BCL10*, *CAD40*, *GADD45A* o *TNFRS10B* y disminuciones en genes que codifican para proteínas relacionadas con el control negativo de la muerte celular, como *BCL2L1* o *BIRC3*. Tal y se muestra en la **figura 24.b**, es también reseñable el aumento en la expresión de *BNIP3*, relacionado con el poro de transición mitocondrial. En este experimento únicamente se ha valorado la expresión del mRNA, que no siempre tiene que suponer una activación de la proteína o de la vía en la que participe, para lo cual haría falta estudios complementarios.

Progresión del ciclo celular

Como evaluación última del efecto sobre la supervivencia celular de la ausencia de PP2Cm se analizó la progresión del ciclo celular en 24h en fibroblastos del paciente. Como se muestra en la **figura 24.c**, no se encontraron diferencias en la proporción de células en cada fase del ciclo comparado con fibroblastos control.

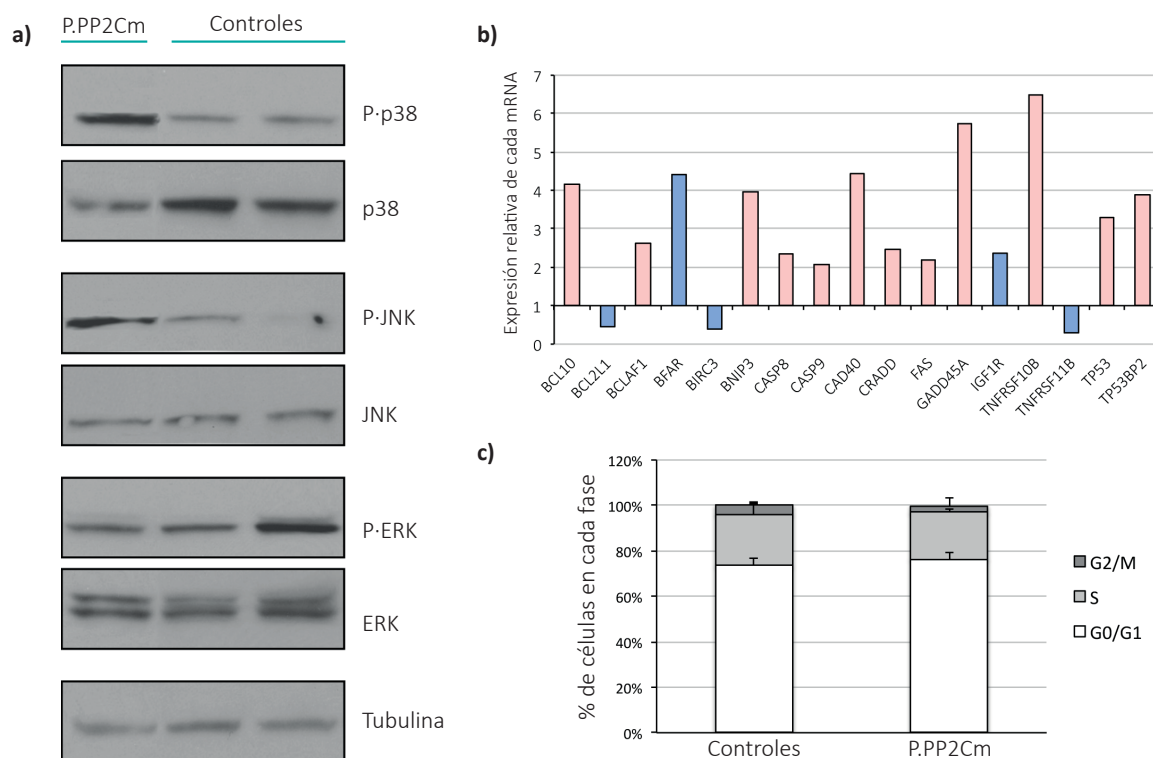


Figura 24_ Análisis de la implicación de PP2Cm en la apoptosis y ciclo celular: **a)** Análisis por western blot de la fosforilación de las proteínas p38, JNK y ERK en extracto total de proteína de los fibroblastos de controles y del paciente PP2Cm. Al término del experimento, las membranas fueron deshibridadas y probadas contra la proteína Tubulina como control de carga. Las fotos que se muestran son recortes representativos de la menos n=3 experimentos. **b)** Selección de genes cuya expresión se veía aumentada más de dos veces o disminuida a la mitad según el análisis del array de expresión de genes relacionados con la apoptosis. En cuarzo, los genes pro-apoptóticos, y en azul los anti-apoptóticos **c)** Evaluación de la proporción de células en cada fase del ciclo celular durante 24h. Los datos son el promedio de al menos n=3 experimentos; los controles son el promedio de tres líneas de fibroblastos control diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Análisis estadístico T de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005).

3.3 | Ausencia de la proteína quinasa BCKDK: respuesta de la mitocondria

88 Habiéndose descrito una implicación de la disfunción mitocondrial en la etiopatología de los síndromes de espectro autista, y habiendo registrado un aumento en el anión superóxido y bajada en la capacidad de síntesis de ATP de los fibroblastos de los pacientes BCKDK, con hiperactividad en el complejo BCDKDH, se investigó la respuesta de la mitocondria a este estado alterado.

A) Función y dinámica mitocondrial en pacientes BCKDK

Dado que las mitocondrias se proponen como orgánulos dinámicos capaces de regular su estructura interna en respuesta a las necesidades celulares, para aproximarnos al estudio de esta variación hemos analizado dos aspectos: por una parte, la función en un medio más oxidativo en el que se forzase la respiración mitocondrial mediante la sustitución de glucosa por galactosa 1g/L durante 24h y la adaptación de la forma a dicha función.

El cambio al medio más oxidativo (galactosa) resultó en un incremento en la respiración mitocondrial en todas las líneas celulares, observándose que los fibroblastos de P.BCKDK_1 igualaban en su perfil respiratorio a los controles, y los de P.BCKDK_2 mantenían una capacidad respiratoria disminuida, siendo especialmente llamativa la deficiencia en respiración máxima (fig. 25.a).

Seguidamente, asociado a las variaciones en la función respiratoria se analizó la morfología mitocondrial mediante el estudio de la ultraestructura de las mitocondrias a partir de fotos de diez mil aumentos obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. Se centró el análisis en dos parámetros: la longitud y aspecto tubular de las mitocondrias y la densidad a electrones de la matriz mitocondrial. Nuevamente, se estudiaron estas características en las dos situaciones mencionadas: fibroblastos crecidos en medio de cultivo estándar y en DMEM en el que la glucosa había sido reemplazada por galactosa.

La elongación mitocondrial se valoró como la relación entre el eje mayor y el eje menor de la hipotética elipse a la que se ajustaría la forma de la mitocondria. Las mitocondrias de ambos pacientes BCKDK mostraron una proporción eje mayor – eje menor aumentada frente a los controles: esto es, mitocondrias más alargadas y tubulares, en contraposición a las mitocondrias más cortas y anchas que encontrábamos en controles (fig.25.c). El análisis de las células crecidas en galactosa en lugar de glucosa reveló que únicamente los fibroblastos control respondieron en un reajuste en su morfología, observándose mitocondrias más alargadas que en presencia de glucosa. En los fibroblastos de pacientes BCKDK no se observó ningún cambio al pasar del medio de crecimiento de glucosa a

galactosa. Este alargamiento mitocondrial también se constató en los fibroblastos interferidos, que mostraban un incremento en el “aspecto” frente a los controles interferidos con el plásmido vacío.

Por otra parte, un aumento en la densidad de matriz mitocondrial está asociado a un aumento en los complejos proteicos de la mitocondria. Para ello, sobre las mismas preparaciones, se tomaron tres puntos al azar de la matriz mitocondrial y tres de la región citosólica que la rodeaba, midiéndose la intensidad de gris, obteniendo así valores absolutos más bajos para los puntos más electrodensos (fig. 25.d). Comprobamos un aumento significativo en la densidad de la matriz mitocondrial en los fibroblastos de P.BCKDK_1, registrado como una disminución hasta un 0.85 en la intensidad respecto a los valores del control. Para las mitocondrias de P.BCKDK_2 no vimos ninguna alteración significativa en la electrodensidad.

La fusión mitocondrial en células de mamíferos requiere la interacción de, entre otras proteínas, las dos mitofusinas de la membrana externa (Mfn1 y Mfn2) con la GTPasa OPA1, localizada en la membrana mitocondrial interna. Estudios recientes han relacionado la proteólisis de OPA1 como un evento pro-fusión. Por tanto, se analizó el patrón de expresión de OPA1 en los fibroblastos de pacientes BCKDK y controles, crecidos en glucosa y galactosa. Los pacientes crecidos en glucosa, mostraron un aumento en el procesamiento de OPA1 (evidenciado como un aumento en la proporción de banda de 80 kDa sobre el total de OPA1 registrado). Siguiendo en línea con lo observado mediante el análisis de la ultraestructura, se observó un aumento en el procesamiento de OPA1 en los fibroblastos controles crecidos en galactosa frente a los crecidos en glucosa, relacionándolo con la elongación mitocondrial

Se valoró también la expresión de la proteína Mitofusina 2 (Mfn2). Esta proteína, localizada en la membrana externa, ejerce no sólo un control sobre la fusión-fisión mitocondrial, sino también como importante modulador del metabolismo mitocondrial. Ambos pacientes BCKDK mostraron un aumento no estadísticamente significativo en los niveles de Mfn2, con valores similares a los controles.

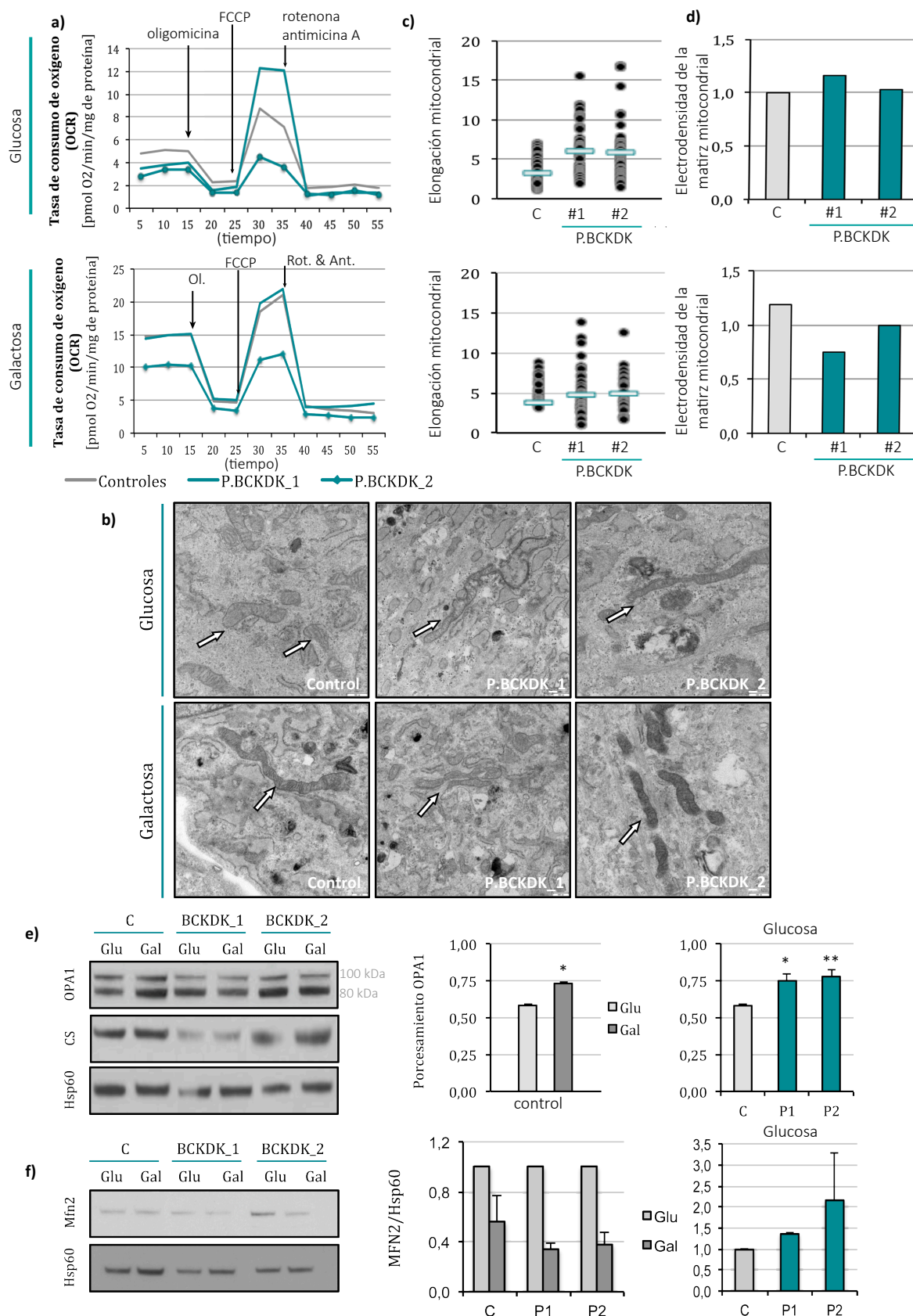


Figura 25 Respuesta de las mitocondrias a la deficiencia en BCKDK: (Pie de figura en la página siguiente)

(Página anterior)

Figura 25_ Respuesta de las mitocondrias a la deficiencia en BCKDK: Análisis de la función mitocondrial y su impacto en la morfología y dinámica en un medio de cultivo con glucosa y otro con galactosa 1g/L durante 24h **a)** Perfil de consumo de oxígeno al crecer las células en galactosa (panel inferior) comparado con el observado previamente en glucosa (panel superior). **b)** Morfología mitocondrial (flechas blancas) al crecer las células en glucosa o galactosa. Fotos representativas a 10.000 aumentos obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. En base a estas fotos se midió la elongación mitocondrial, según la relación entre el eje mayor y menor que definirían una hipotética elipse **(c)** y la electrodensidad de la matriz por comparación con el citosol **(d)**. El análisis de la dinámica mitocondrial se completó con un estudio de las proteínas de fusión OPA1 y Mfn2, valorando el procesamiento de OPA1 como la intensidad de la banda de 80 kDa sobre la de 100 kDa **(e)**, y la variación expresión de Mfn2 normalizada por el control de carga Hsp60 **(f)**

91

B) Respiración mitocondrial en ausencia de BCKDK: modelos de interferencia

En el perfil respiratorio de los fibroblastos de los pacientes BCKDK observábamos una diferencia notable en la capacidad de respiración de reserva: mientras el paciente 1 mostraba una respiración máxima muy incrementada frente a los controles, en P.BCKDK_2 estaba, por el contrario, más reducida.

Las diferencias entre un paciente y otro son normales y esperables, consecuencia de utilizar modelos naturales: cada paciente porta la mutación en estudio en un fondo genético concreto y desconocido, que puede afectar a la capacidad de adaptación de la célula a la situación metabólica. Para aislar el efecto de la ausencia de BCKDK del fondo genético de los pacientes se generó un modelo de fibroblastos control en los que se interfirió la expresión de *BCKDK* mediante la infección lentiviral de partículas que expresaban shRNAs específicos contra este gen.

Generación del modelo de interferencia

Se ensayaron tres shRNAs dirigidos contra distintos fragmentos del gen. El éxito en la interferencia se midió a diferentes niveles: se evaluaron los niveles de mRNA *BCKDK* y la presencia o ausencia de proteína BCKDK, así como de sustrato fosforilado. Observamos una disminución de la expresión de *BCKDK* a menos de un 20% al interferir con dos de los shRNAs probados, y aproximadamente un 60% con el tercero (fig. 26.a). Al valorar la fosforilación de BCKDH y la presencia de proteína se constató que con la interferencia lograda en los shRNAs #1 y #2 se conseguía bloquear la fosforilación de BCKDHA detectable por Western blot, con lo que se seleccionaron estos dos interferentes para seguir evaluando la función mitocondrial

Evaluación de la función respiratoria en los modelos interferidos

Como se observa en la figura 26, en ambos interferentes se registró un perfil de respiración similar al observado en el paciente BCKDK_2, con disminuciones en las respiraciones basal, máxima y sensible

a oligomicina respecto al control (fig. 26.c). Se evaluó también la concentración de ATP en las células interferidas, igual que se hizo anteriormente con los fibroblastos de los pacientes, constatándose una reducción en la concentración total de ATP, tal y como se muestra en la figura 26.d.

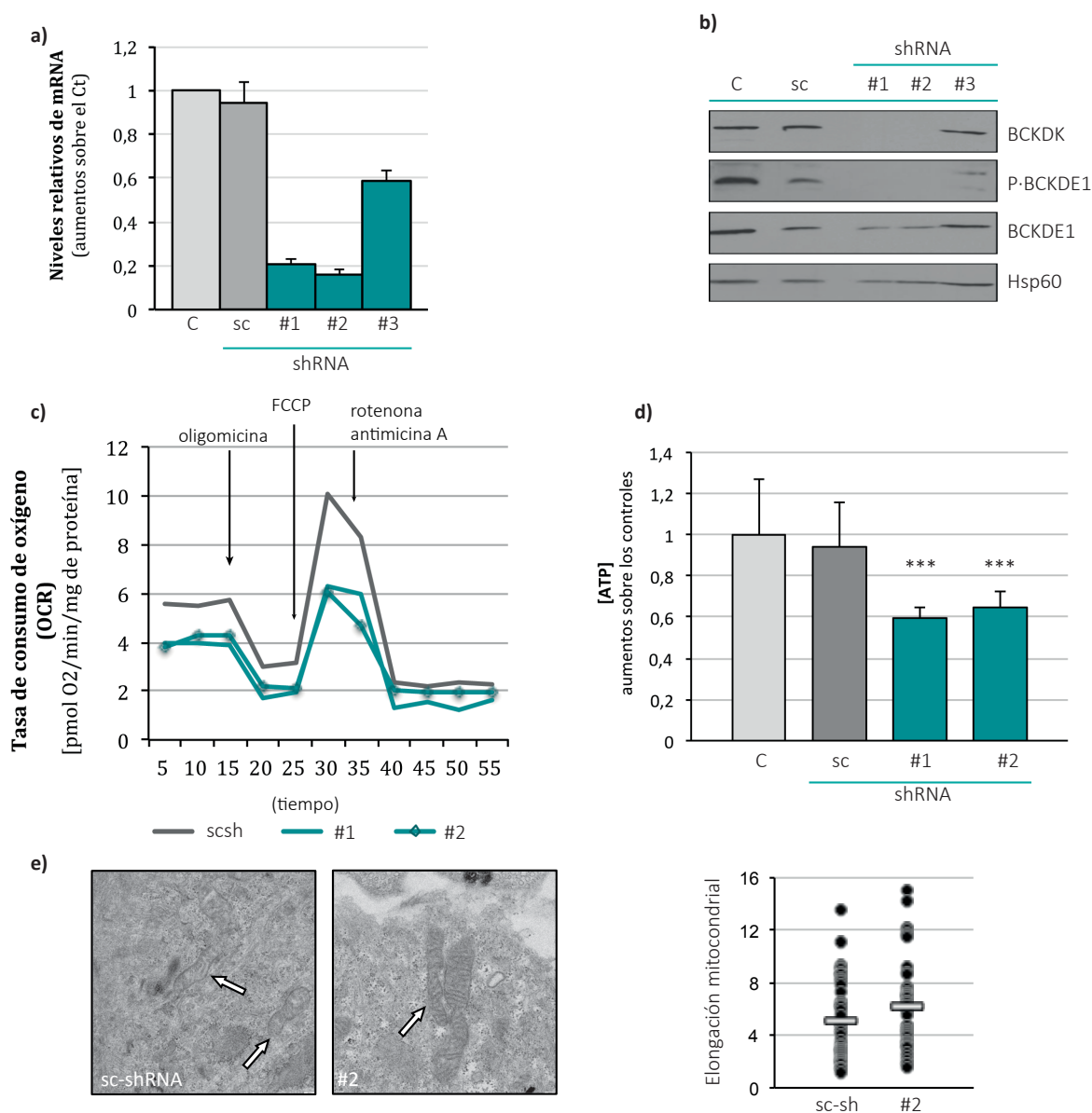


Figura 26 Interferencia de la expresión de *BCKDK* y respuesta mitocondrial: Se creó un modelo de células cc2509 interferidas para la expresión de *BCKDK* mediante la infección lentiviral de shRNAs. Se comprobó la eficacia de la interferencia mediante cuantificación de transcritos de *BCKDK* por qRT-PCR (a) al infectar con un shRNA no dirigido (sc-shRNA) y los tres shRNAs probados (#1, #2 y #3). También se analizó la presencia o ausencia de proteína *BCKDK* tras la interferencia, así como la fosforilación de su sustrato, el complejo *BCKDH* (b). c) En los shRNAs #1 y #2, en los que se demostró mejor interferencia, se analizó el perfil de consumo de oxígeno a tiempo real y la concentración de ATP total (d). Definido el perfil de OCR típico de un déficit en *BCKDK* se analizó la elongación mitocondrial mediante la toma de fotografías por MET a 10.000 aumentos y evaluación del ratio eje mayor:eje menor de la hipotética elipse que dibujaría la mitocondria (e).

La evaluación del impacto de la interferencia sobre la morfología mitocondrial se realizó en base a fotografías obtenidas a 10.000 aumentos por microscopía electrónica de transmisión para las líneas interferidas con el shRNA #2 y con el control (vector de interferencia vacío). Se analizaron como se había hecho anteriormente para los fibroblastos de los pacientes BCKDK, midiendo la elongación mitocondrial en base al aspecto tubular, como la razón del eje mayor/ eje menor de la hipotética elipse. Se observó que la interferencia de la expresión de *BCKDK* conducía al alargamiento de las mitocondrias, reproduciendo las observaciones sobre los pacientes BCKDK.

93

Definida la respuesta de la mitocondria en ausencia de BCKDK se exploró la expresión de complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondriales en los fibroblastos de controles interferidos y de los pacientes BCKDK. Se constató un aumento en la presencia de proteínas de los complejos mitocondriales únicamente en fibroblastos del paciente BCKDK_1, que no se explicaban por aumentos en la carga mitocondrial. No se observaron variaciones o incluso se detectaron disminuciones en los complejos de algunas de las líneas interferidas (fig.27).

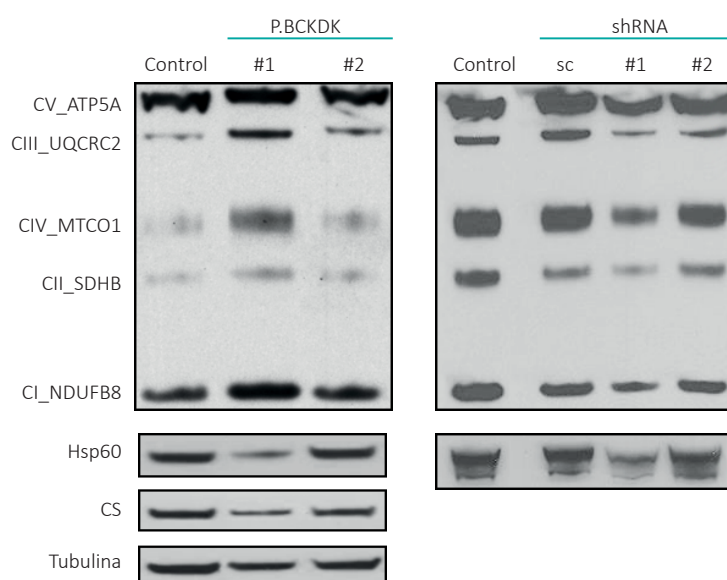


Figura 27_ Análisis de la expresión de los complejos OXPHOS: Se valoró la expresión de los complejos de la cadena transportadora de electrones mediante un Western blot con un cocktail de anticuerpos contra distintas proteínas de los complejos de CTE.

C) Ausencia de BCKDK: Destino celular.

Valorada la disfunción mitocondrial en los fibroblastos de los pacientes BCKDK y ratificado este perfil mediante la utilización de modelos interferidos, se abrió el camino por el que seguir la investigación sobre la patofisiología de este defecto. Concretamente se analizó cómo la respuesta observada afectaba al destino celular y aspecto global de las células.

Se analizó la progresión del ciclo celular en 24h en los pacientes BCKDK, observándose un aumento en la frecuencia de células en la fase G0/G1 en detrimento de la fase G2/M, tomando como normal los valores promedio observados en la frecuencia poblacional en cada fase del ciclo celular en controles.

Un análisis de las células mediante la visualización a bajo aumento en microscopía electrónica de transmisión reveló que tanto los fibroblastos control como los pacientes BCKDK mostraban una gran actividad de degradación, conteniendo numerosos cuerpos multivesiculares y lisosomas. Esta actividad parecería algo mayor en pacientes que en controles, en los que además se puede observar alguna imagen de mitofagia.

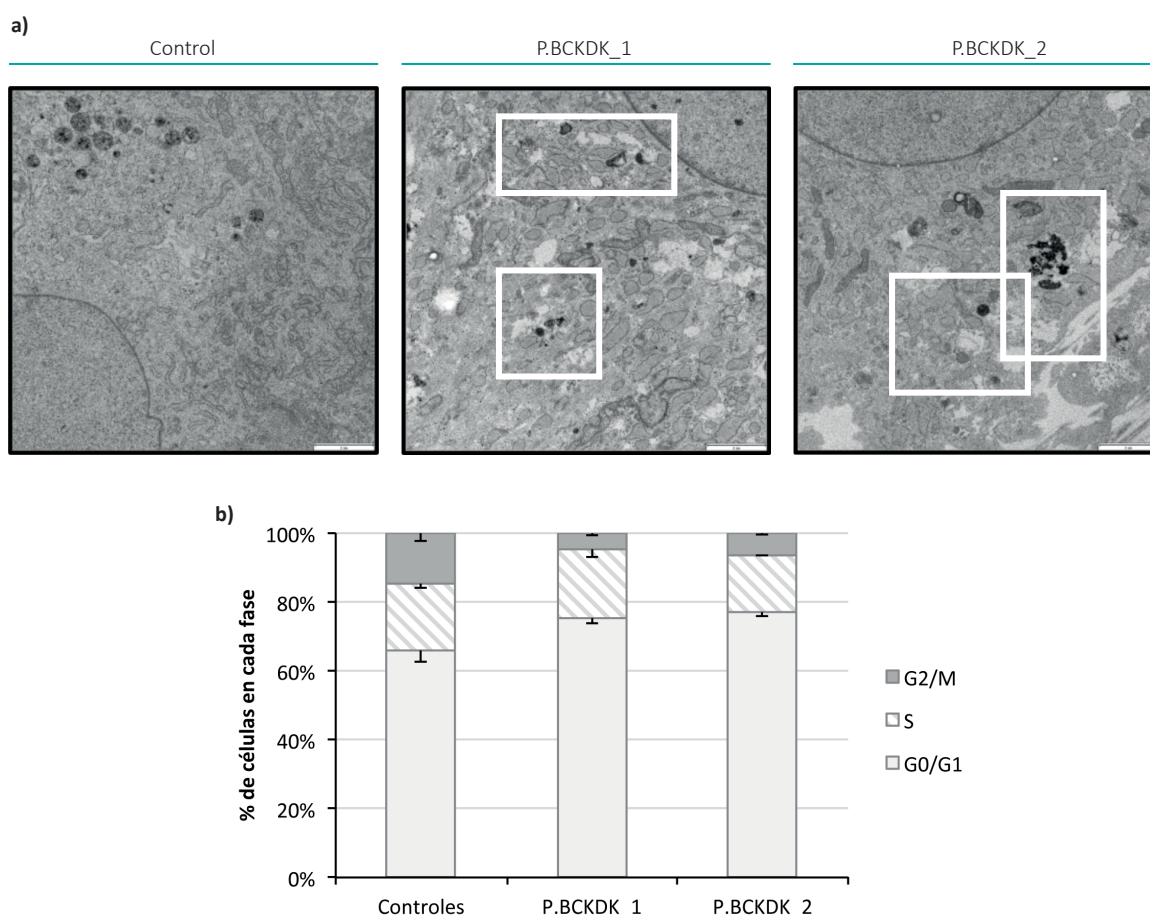


Figura 28_Destino celular en ausencia de BCKDK: **a)** Se valoró el aspecto de las células a 4.000 aumentos mediante microscopía electrónica de transmisión. En recuadro blanco se marcan las imágenes de actividad lisosomal, más patentes en los fibroblastos de los pacientes. **b)** Evaluación de la población celular en cada fase del ciclo celular. Los datos son el promedio de al menos n=3 experimentos; los controles son el promedio de tres líneas de fibroblastos control diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Análisis estadístico T de Student (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005).

5 DISCUSIÓN

1 De la patología al gen: la importancia de la información

Estrategias para la identificación de nuevas mutaciones en patología molecular

Nuevas asociaciones de genes con patología: caracterización funcional de las mutaciones

2 Del gen a la patofisiología: búsqueda de las rutas generales de patogenia

Anión superóxido, respiración mitocondrial y síntesis de ATP: el papel central de la mitocondria

Ausencia de proteína PP2Cm en humanos: ¿algo más que la desregulación de BCKDH?

Ausencia de proteína BCKDK en humanos: respuesta mitocondrial



En el flujo de trabajo presentado al principio de esta Tesis se mostraba cómo se pretendía llegar desde la estratificación clínica y bioquímica de un grupo de pacientes con sospecha de alteraciones poco conocidas en el catabolismo de los aminoácidos ramificados a la descripción de nuevas dianas terapéuticas. Para ello, pasábamos necesariamente por encontrar la mutación causante de la patología y el estudio de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes en la misma. Y ese ha sido, efectivamente, el trabajo realizado, que se discute a continuación. El camino desde la patología al gen, y desde el gen a la patofisiología.

1 | De la patología al gen: la importancia de la información

En plena revolución técnica y conceptual en el campo de la genómica (Koboldt, Steinberg et al. 2013), la secuenciación masiva (NGS, Next Generation Sequencing) está abriendo en todas sus vertientes nuevas posibilidades en la identificación de genes implicados en patología (Lohmann and Klein 2014) y modelando nuestra concepción de los mismos (Schrijver, Aziz et al. 2012). Este trabajo refleja esa evolución conceptual y tecnológica aplicada a la detección y caracterización de mutaciones según el estado del arte del momento. Y es que aunque en todos los casos analizados la estratificación bioquímica situaba el metabolismo de los aminoácidos ramificados en el centro de la sospecha diagnóstica, la ausencia de fenotipo clínico (P.PP2Cm y P.BCATm) o la aparición de una clínica inesperada, como es el autismo de los pacientes BCKDK_1 y BCKDK_2, convertía al diagnóstico genético en el primer objetivo del trabajo, para, partiendo de este punto, completar el recorrido desde la caracterización bioquímica a la implementación del diagnóstico genético y consecuente relación del gen con la patología.

1.1 | Estrategias para la identificación de nuevas mutaciones en patología molecular

El caso más claro de sospecha de genes candidatos por la estratificación bioquímica fue el **diagnóstico genético del paciente PP2Cm**, con un perfil metabólico compatible con una forma variante de MSUD (Rodríguez-Pombo, Navarrete et al. 2006, Simon, Flaschker et al. 2006) y que se caracteriza por un bloqueo en la actividad del complejo BCKDH, que cataliza la descarboxilación oxidativa de los BCKA (Burrage, Nagamani et al. 2014). Tras descartar mediante secuenciación de Sanger la presencia de mutaciones causantes de patología en las regiones exónicas e intrónicas flanqueantes de los genes *BCKDHA*, *BCKDHB*, *DBT* y *DLD*, descritas hasta ese momento como posibles causantes de las distintas presentaciones de la patología, el siguiente paso fue el análisis de otros eventos genómicos, incluidas deleciones, duplicaciones y variaciones en la zigosidad, que pudieran ser responsables de

la firma bioquímica del paciente o desenmascarar la presencia de mutaciones en genes con patrón de herencia mendeliana y no asociados previamente a la misma. La identificación de regiones de homocigosidad ha sido, y sigue siendo a día de hoy, de gran utilidad para la detección de mutaciones cuando no existe un gen candidato (Kuhlenbaumer, Hullmann et al. 2011, Eccleston, Koh et al. 2012, Khan, Mohan et al. 2016, Niida, Yokoi et al. 2016), ya que permite detectar regiones con patrones de herencia alterados que pueden albergar mutaciones que en otra situación génica hubiesen pasado desapercibidas (Cottrell, Mendell et al. 2012). El *array* de SNP que realizamos sobre el DNA genómico del paciente PP2Cm (Papenhausen, Schwartz et al. 2011) reveló que, sin haber variaciones en el número de copia, existía una pérdida de heterocigosidad completa del cromosoma 4, siendo el patrón completamente normal para el resto.

Esta alteración centró la atención sobre el gen *PPM1K*, localizado en el cromosoma 4 y descrito antes como posible fosfatasa reguladora del complejo BCKDH en ratones (Lu, Sun et al. 2009). La secuenciación de Sanger demostró la presencia de una variación en homocigosidad, el cambio c.417_418delTA, una delección de dos pares de bases que producía un cambio en la fase de lectura, generándose un codón de parada prematura. El perfil de segregación mendeliana de la mutación (padre portador heterocigoto y madre homocigota wt en ambos alelos) sugiere una isodisomía uniparental paterna (Lapunzina and Monk 2011), en la que el paciente porta y expresa las dos copias del cromosoma 4 paterno y ninguna del materno. El resultado de esta herencia discordante es que la mutación, que ante un patrón de herencia normal se habría expresado en heterocigosidad, aparece en homocigosidad en el paciente.

El abordaje para el diagnóstico del paciente PP2Cm ratifica la utilidad del mapeo de homocigosidad para desvelar nuevas variantes de herencia recesiva asociadas a patología (King, Dexter et al. 2014, Matsubara, Kataoka et al. 2014, Tamura, Isojima et al. 2015, Donovan, Kimble et al. 2016). Las disomías uniparentales pueden originar diferentes patologías según los cromosomas o regiones cromosómicas afectadas, pudiendo variar de hecho el fenotipo según se trate de una disomía uniparental paterna o materna, en función de las regiones de impronta que contenga (Yamazawa, Ogata et al. 2010). Por tanto, más allá de la herencia discordante y concomitante expresión en homocigosidad de la mutación, no podemos asegurar, con los estudios realizados, que esta sea o vaya a ser en un futuro el único efecto clínico de la aparente UPD (Siegel and Slavotinek 2005, Yamazawa, Ogata et al. 2010).

Una situación muy diferente fue la de los **pacientes BCKDK**, en los que el perfil de metabolitos en plasma al diagnóstico mostraba una reducción específica en las concentraciones plasmáticas de BCAAs y sus derivados α -cetoácidos. El primer paso fue por tanto establecer de forma específica la “firma metabólica” de la patología, recurriendo para ello al marcaje con isótopos estables de sustratos celulares y análisis posterior del producto inmediato. Las aproximaciones metabolómicas permiten establecer una relación entre el fenotipo de una enfermedad y un patrón concreto de metabolitos alterados, clave de la función biológica (Kim, Lee et al. 2013). Esta firma metabólica resulta de gran utilidad para ajustar el diagnóstico bioquímico y ampliar la información sobre el defecto metabólico (Ferrer, Ruiz-Sala et al. 2007). En el caso que nos ocupa, crecer los fibroblastos de los pacientes en

presencia de leucina radioisotópicamente marcada como única fuente de BCAAs (Bixel, Engelmann et al. 2004, Matsumoto, Akita et al. 2010) permitió relacionar la bajada en BCAA con la sospecha de una hiperactividad constitutiva en el catabolismo de los aminoácidos ramificados.

Identificada la hiperactividad del metabolismo de los BCKAs sospechamos de un defecto en las proteínas reguladoras, con lo que analizamos la secuencia del gen *BCKDK*, codificante para la quinasa responsable de fosforilar e inactivar el complejo BCKDH. Para ello empleamos dos tecnologías diferentes: por una parte, en el diagnóstico del paciente P.BCKDK_1, secuenciación masiva de exoma completo, y por otra, en el paciente P.BCKDK_2, la secuenciación directa por el método de Sanger del gen indicado. En ambos casos se identificaron variaciones de secuencia nucleotídica, los cambios c.520C>G y c.1166T>C, en homocigosis en cada paciente respectivamente. Aunque la secuenciación de exoma celular ha resultado de gran utilidad para la descripción de genes asociados a patología, especialmente en el marco de las enfermedades raras (Nguyen and Charlebois 2015) o en enfermedades de amplia presentación fenotípica y fondos genéticos muy heterogéneos (Vega, Medrano et al. 2016), este caso ilustra como ambas aproximaciones permiten indistintamente llegar a la mutación causante de patología, cuando la estratificación clínica y/o bioquímica está bien fundamentada. No obstante, ante la sospecha de un único gen candidato o de una mutación ya conocida por historia familiar, puede resultar más coste-efectiva la secuenciación por Sanger (Christensen, Dukhovny et al. 2015, Vega, Medrano et al. 2016).

Por último, y como ejemplo de entre los casos presentados en este trabajo de la revolución de la secuenciación masiva, realizamos el diagnóstico genético del paciente BCATm mediante la secuenciación de su exoma clínico. El panel de exoma clínico es la secuenciación de un grupo de genes relacionados con distintas patologías de herencia mendeliana, descritas en OMIM (Dello Russo, Di Giacomo et al. 2014, Vega, Medrano et al. 2016), y permite el análisis efectivo de más de 4.000 genes relacionados con patología en humanos, lo que lo hace especialmente interesante para casos como el que nos ocupa, en el que detectamos una alteración en el metabolismo de los aminoácidos ramificados pero no disponíamos de una sospecha de genes candidatos concretos. Y es que en este caso, el incremento en los niveles de BCAA en fluidos corporales no se reflejaba en un aumento similar en los niveles de cetoácidos, por lo que no se asemejaba completamente a un fenotipo de MSUD. La secuenciación del exoma clínico reveló una inserción-delección bialélica en el gen *BCAT2*, que codifica para la transaminasa mitocondrial de aminoácidos ramificados –BCATm–.

La secuenciación masiva supone el acceso a una enorme cantidad de información, lo que hace imprescindible su correcto filtrado (Dolled-Filhart, Lee et al. 2013), bien basándonos en la genealogía del paciente (Bahlo, Tankard et al. 2014) o en las características que tendría la mutación del gen candidato (Teare and Santibanez Koref 2014). Así, ante todos los cambios que aparecen tras los primeros controles de calidad de la lectura (regiones bien secuenciadas, bien cubiertas, etc.), hay que establecer distintos filtros lógicos para aislar la variante de interés. En nuestro caso establecimos tres primeros filtros. El primer requisito fue que la frecuencia alélica en población control fuese menor de un 0,5% ($MAF \leq 0,05$) o desconocida, que establecimos en dicha frecuencia por estar trabajando en

el marco de las enfermedades raras, con lo que ningún cambio candidato podría tener una frecuencia alta en la población control. Los siguientes filtros fueron que los cambios no fuesen sinónimos y que encontrásemos al menos dos cambios por gen, asumiendo una herencia recesiva. El correcto diagnóstico genético de este paciente ilustra cómo la secuenciación masiva puede ser una herramienta de gran utilidad para las situaciones en las que el perfilado bioquímico apunta a múltiples posibles causantes, permitiéndose así la lectura de todos los candidatos en un solo experimento.

El diagnóstico genético de los tres subtipos de pacientes presentados muestra la variedad de estrategias para llegar a la identificación del gen causante. En todos los casos hemos ido del fenotipo al genotipo, poniéndose así de manifiesto la importancia de la estratificación clínica y bioquímica previa para establecer un correcto diagnóstico genético, ya bien sea en el caso de secuenciación de genes candidatos o en la búsqueda de mutaciones mediante secuenciación masiva.

1.2| Nuevas asociaciones de genes con patología: Caracterización funcional de las mutaciones

La caracterización génica es únicamente el comienzo de un proceso dirigido a validar el papel patogénico de la variante identificada y seleccionada. Y es que el establecimiento de una correlación entre el genotipo y el fenotipo de una patología resulta de gran utilidad en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, resultando necesario como punto de partida previo al estudio de los mecanismos moleculares que expliquen la patofisiología. Esta correlación se establece desde el análisis funcional de las mutaciones. En las tres situaciones metabólicas que tratamos hemos encontrado mutaciones que podrían ser candidatas a causantes de la patología; señalan a genes conocidos como participantes clave en el catabolismo de los BCAA (como el caso de *BCKDK* o *BCAT2*) o no descritos previamente (*PPM1K*), con una relación con la patología poco o nada descrita. Si bien se había postulado tanto en el caso de la fosfatasa como en el de la quinasa una relación con la regulación de *BCKDH* (Shimomura, Nanaumi et al. 1990, Harris, Joshi et al. 2004, Lu, Sun et al. 2009, Wynn, Li et al. 2012), no existía ningún paciente descrito hasta el comienzo de este trabajo.

Las mutaciones en *PPM1K* y *BCAT2* producían un cambio en la fase de lectura que resultaba en la aparición de un codón de parada prematura, que concluirían (como se corroboró en los estudios en cDNA y proteína en ambos casos) en una proteína truncada no funcional. Son las que conocemos como mutaciones de pérdida de función o “loss of function (LOF)”.

Las mutaciones en *BCKDK*, por su parte, parecían de tipo *missense* o de cambio de aminoácido, pero el análisis sobre el cDNA reveló que la del paciente P.BCKDK_1 era en realidad una mutación de *splicing*. La mayoría de estas mutaciones se producen en las bases más próximas al punto de unión exón-intrón, o se deben a que el cambio supone en si mismo a la generación de un nuevo sitio de *splicing*. Sin embargo, en este caso, el cambio C>G, a 24 pares de bases 3' del sitio normal de *splicing*, no forma parte del nuevo sitio GT 5' donador, sino que probablemente sea reflejo de un aumento en

su complementariedad con la región de U1 snRNP, de tal manera que con la nueva base pasa a tener un punto más de unión, aumentando la probabilidad de que las bases GT que le siguen actúen como sitio de *splicing* reconocido por la maquinaria de procesamiento (Sanchez-Alcudia, Perez et al. 2011). Esta generación de un nuevo sitio de *splicing* en el interior del exón 6 resulta en un procesamiento aberrante del transcrito entre los exones 6 y 7 que conduce a un cambio en la fase de lectura y aparición de un codón de parada prematura.

101

El análisis de la expresión de la proteína en fracción mitocondrial aislada reveló que el paciente BCKDK_2, portador homocigoto de una mutación que sí era *missense*, expresaba a niveles muy reducidos proteína BCKDK de tamaño normal, mientras que el paciente BCKDK_1 no expresaba nada de proteína detectable. En el caso de la mutación de *splicing* la explicación es sencilla, dado que, la generación de un codón de parada prematura, activaría la maquinaria NMD, encargada de eliminar transcritos aberrantes, pero menos evidente en la mutación L389P. La proteína BCKDK se expresa en rata en un estado oligomérico, formando un heterotetrámero (Wynn, Chuang et al. 2000, Machius, Chuang et al. 2001), encontrándose el residuo leucina 389 en la interfaz entre dímeros. La ausencia de expresión de la proteína BCKDK p.L389P sugiere que la dimerización de BCKDK es esencial para su actividad quinasa y estabilidad in vivo.

Si bien es cierto que no en todas las patologías, o más exactamente, no en todas las mutaciones, se puede establecer una relación directa entre la severidad de la mutación y la expresión fenotípica de la enfermedad (Nellis, Kasinski et al. 2003, Nur, Gencpinar et al. 2015), sí parece existir una relación más directa cuando se trata de mutaciones de pérdida de función, como las identificadas en los pacientes PP2Cm y BCATm. En los pacientes BCKDK, al tener dos mutaciones distintas, podemos estudiar la relación entre el genotipo y el fenotipo. El primer paciente, con una mutación de *splicing* y sin proteína detectable, presentaba una forma más grave de la enfermedad, con disminuciones en los niveles de BCAA en fluidos al diagnóstico más marcadas que el paciente P.BCKDK_1, que aún con grandes disminuciones frente a los controles, era portador de una mutación *missense* y proteína detectable, que podría justificar la presencia de una actividad BCKDK residual y fenotipo menos grave. El análisis funcional justificaría al menos parcialmente la diferencia entre pacientes con defectos en la misma proteína, como ya se ha observado en otras enfermedades metabólicas (Carrozzo, Verrigni et al. 2016). Los estudios presentados ratifican la importancia del correcto genotipado y estudio de las mutaciones para establecer las relaciones genotipo-fenotipo y como base para el diseño y desarrollo de intervenciones terapéuticas (Fernandez-Guerra, Navarrete et al. 2010).

El rescate de la función de la vía afectada permite la validación última de la implicación de la proteína estudiada en la ruta metabólica. En el caso de las dos proteínas reguladoras del complejo, no relacionadas previamente con patología, utilizamos dos aproximaciones diferentes. Aunque el concepto en ambos casos fue el mismo -dada la ausencia de proteína reguladora, expresamos la proteína en las células de los pacientes y valoramos la recuperación de la actividad del complejo BCKDH-, el abordaje fue distinto en cada caso.

Para la proteína fosfatasa PP2Cm, cuyos fibroblastos presentaban una actividad basal de un 15% respecto a los controles, realizamos una expresión transitoria de la proteína PP2Cm-wt en los fibroblastos del paciente y medimos la tasa de descarboxilación de la leucina normalmente. Este método de valoración de la actividad es muy sensible, lo que nos permitió detectar variaciones más sutiles. La expresión transitoria implicó trabajar en cultivos celulares no homogéneos, en los que las células exitosamente transfectadas podrían estar enmascaradas por las células que no lo estaban.

La recuperación de la activación normal del complejo BCKDH en los fibroblastos de los pacientes BCKDK se valoró mediante el análisis del perfil de fosforilación del complejo por Western blot. Dado que esta aproximación es menos sensible que la anterior, se infectaron los fibroblastos de los pacientes con lentivirus conteniendo la forma wt del gen de interés asociado mediante una secuencia IRES a la expresión de la proteína eGFP, lo que permitió la expresión estable de la proteína BCKDK y la selección de poblaciones homogéneas y correctamente infectadas, sin que interfiriese en la estabilidad o función de BCKDK. La restauración del patrón de fosforilación normal del complejo mediante la expresión de la quinasa supuso la validación de las mutaciones descritas como responsables de la alteración en la vía metabólica.

La aproximación de recuperación de la expresión normal de una proteína mediante expresión transitoria es más económica, sencilla y rápida que la expresión estable, pero requiere de metodologías de detección del efecto de la expresión más sensibles, que permitan no trabajar en cultivos homogéneos. La expresión estable, aunque más laboriosa, permite sin embargo disponer de cultivos seleccionados (en este caso por citometría de flujo) en los que todas las células expresan la mutación, abriendo más posibilidades analíticas.

La descripción de nuevos pacientes con defectos en genes implicados en una vía metabólica hasta ahora no relacionados con patología permite tanto el conocimiento de la propia vía como el estudio de la implicación fisiológica del gen y la variación estudiada. Los tres casos aquí presentados van en la misma dirección.

En el caso de la fosfatasa era esperable un fenotipo similar a una forma suave de Jarabe de Arce, por el aumento en los niveles de aminoácidos ramificados y por comparación con la deficiencia en las fosfatasas del complejo PDH (Maj, MacKay et al. 2005). Aun así, cabe preguntar la misma cuestión que se plantea en el caso de la regulación de la piruvato deshidrogenasa: ¿se trata de una nueva enfermedad huérfana, o de un estado infradiagnosticado? (Maj, Cameron et al. 2006). A la luz de los resultados presentados en este trabajo, podríamos concluir que se presenta, de hecho, una situación conjunta: por una parte, el menor conocimiento de este gen y su posible implicación en patología hacían -y hacen a día de hoy- de este un candidato no estudiado ante aumentos en las concentraciones de BCAA (Bashyam, Chaudhary et al. 2012, Abiri, Karamzadeh et al. 2016). Por la otra parte, hemos observado diferencias moleculares entre las células de este paciente y muestras de otros pacientes Jarabe de Arce con incrementos equiparables en las concentraciones de BCAA, que sugieren un nuevo fenotipo molecular para este subtipo de MSUD, como se discutirá a continuación.

A la fecha de depósito de esta Tesis Doctoral no se ha descrito ningún otro paciente con mutaciones en el gen *PPM1K*.

La descripción de los pacientes BCKDK abrió un nuevo campo de estudio; si bien se había teorizado sobre el fenotipo molecular de una deficiencia en BCKDK y se había estudiado sobre el modelo de ratón, en el que se observaban decrementos en los niveles de BCAA, así como crisis epilépticas, retrasos en el desarrollo y alteraciones morfológicas, la descripción de los primeros pacientes (Novarino, El-Fishawy et al. 2012) permitió relacionar las disminuciones en BCAA con el desarrollo clínico observado: un síndrome de espectro autista y retraso en el desarrollo. En el citado artículo, la Dra. Novarino y colaboradores, partiendo de una cohorte de pacientes con epilepsia y comportamiento autista establecen, mediante secuenciación masiva, cambios en el gen BCKDK como responsables de la patología. Además, establecen las similitudes entre el fenotipo del modelo animal y la presentación en pacientes y avanza en la relación genotipo-fenotipo, describiendo diferencias con los controles más sustanciales para las mutaciones nulas que para las missense. Un estudio de metabolitos en cerebro de ratón sugirió un desbalance entre los aminoácidos neutros que utilizan el mismo sistema de transporte a través de la barrera hematoencefálica que los BCAA a raíz de las caídas en la concentración de los últimos, subyaciendo en la patología. El estudio de los dos pacientes publicados en esta Tesis ratifica la relación entre genotipo y fenotipo para esta patología, y avanza, como se discute en el siguiente epígrafe, en la implicación de la mitocondria en la patofisiología de este nuevo defecto.

Conocer la mutación el gen causante de la enfermedad nos permite definir la patología y actuar en consecuencia, con un impacto directo sobre el paciente. En el caso de la mutación en *PPM1K*, el paciente había sido puesto bajo restricción dietética de BCAAs desde el diagnóstico bioquímico, por similitud con una forma variante de MSUD, con lo que el diagnóstico genético nos ha permitido ratificar la opción terapéutica, que posiblemente haya modificado la historia natural de la enfermedad. De manera similar, conocer la mutación en *BCAT2* nos ha permitido comparar el caso con el único paciente descrito en la literatura (Wang, Li et al. 2015), sentando la base para el estudio del desarrollo de la patología en el paciente y el ajuste de las condiciones dietéticas.

La identificación de estas mutaciones en *BCKDK* sugieren la implementación de una medida de la concentración de BCAAs en plasma en neonatos con microcefalia a fin de detectar posibles defectos en dicho gen. En los programas de cribado neonatal ampliado se cuantifica de manera rutinaria la concentración de BCAAs en sangre mediante espectrometría de masas en tándem, con lo que, a la luz de estos resultados, recomendaríamos prestar atención no sólo a los aumentos en estas concentraciones, sino también a las disminuciones. Estos resultados abren la puerta al diagnóstico precoz para otros pacientes (en los que se recomendaría suplementación de BCAAs en dieta ante una disminución medida, para evitar el daño neurológico irreversible) así como para el estudio de otros subtipos de autismo.

Además, en el caso de los pacientes BCKDK, obtenido el diagnóstico genético, se ha diseñado e implementado un tratamiento basado en dieta hiperproteica, a fin de normalizar las concentraciones de aminoácidos en plasma. Se comenzó con una dieta de 2g/kg/día de proteína, suplementado con 100mg/kg/día de BCAAs cada 6 horas, pero resultó insuficiente, por lo que se aumentó a una ingesta natural de 3,5g/kg/día de proteína, más 100mg/kg/día de BCAAs cada 5 horas, incluyendo una alimentación continuada mediante sonda de gastrostomía. Por razones técnicas, solamente el paciente BCKDK_1 ha seguido efectivamente el tratamiento. Seis meses más tarde mostraba menos hiperactividad y mantenía la atención durante más tiempo, así como mejorías en la comunicación, socialización y capacidades motoras gruesas, siendo capaz de andar de manera autónoma durante unos segundos.

En los casos que hemos analizado, además, tratarse de mutaciones nulas nos ha permitido, al tener muestras de los pacientes, disponer de modelos KO naturales en los que abordar la caracterización y posterior definición del defecto sobre la función celular, contribuyendo al aumento en el cuerpo de conocimiento sobre esta enfermedad concreta y sobre el metabolismo de los BCAA en general (Alkuraya 2015, Alkuraya 2015), permitiendo así la búsqueda de mecanismos de acción terapéutica.

2 | Del gen a la patofisiología: búsqueda de rutas generales de patogenia

105

La descripción de las mutaciones y la relación entre el genotipo y el fenotipo nos permite, como se ha razonado, realizar el diagnóstico de los pacientes y establecer una opción terapéutica. Pero para avanzar en la búsqueda de dianas de acción más allá de la propia ruta metabólica alterada es necesario conocer los mecanismos patofisiológicos que subyacen en la enfermedad. En esta segunda parte del trabajo nos centramos en el análisis de la función mitocondrial ante las alteraciones descritas, a fin de desvelar su papel en la patofisiología de los estados derivados de la desregulación del complejo BCKDH.

Centramos nuestra atención en este orgánulo por varios motivos. Por una parte, el catabolismo de los aminoácidos ramificados es un proceso eminentemente mitocondrial, y la reacción que constituye su paso limitante y sobre la que se ejerce la regulación del catabolismo está catalizada por un complejo multienzimático similar a PDH y KGDH, de gran importancia en el desempeño mitocondrial (Zastre, Sweet et al. 2013, Grimm, Calgeer et al. 2016). Además, un número creciente de estudios relacionan a los aminoácidos ramificados con la función mitocondrial y celular mediante vías de transducción de señales con clara repercusión sobre la mitocondria, como podría ser mTOR (Lynch, Halle et al. 2003, Ramanathan and Schreiber 2009, Jewell, Russell et al. 2013, Schriever, Deutsch et al. 2013). En suma a esto, en cada caso aislado encontramos razones que atraían la atención sobre este orgánulo, como se desarrollará más adelante: la proteína fosfatasa PP2Cm ha sido identificada en modelos animales como elemento clave para la supervivencia mitocondrial, y la presentación clínica de los pacientes BCKDK, enmarcada dentro del espectro autista, se ha relacionado con alteraciones en la función mitocondrial.

En primera instancia valoramos la afectación mitocondrial basándonos en dos parámetros: la generación de anión superóxido y la función respiratoria mitocondrial y capacidad de síntesis de ATP. Establecido este escenario, estudiamos la posible dicotomía entre la alteración a causa de las variaciones en las concentraciones de metabolitos o por la propia ausencia de proteínas reguladoras.

2.1 | Anión superóxido, respiración mitocondrial y síntesis de ATP: el papel central de la mitocondria

Cada vez más estudios han demostrado la existencia de estrés oxidativo en errores congénitos del metabolismo, incluyendo acidurias orgánicas, aminoacidopatías, desórdenes en el metabolismo de los

ácidos grasos y enfermedades peroxisomales (Sitta, Ribas et al. 2014). Empezamos por tanto nuestro análisis por la valoración de la generación de anión superóxido, que se produce cuando un electrón es cedido a una molécula de oxígeno en lugar de a su receptor natural (Murphy 2009), generando una molécula de oxígeno reactiva que puede dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, así como transformarse en otras especies de oxígeno reactivas, con mayor capacidad de difusión (Venditti, Di Stefano et al. 2013). En el análisis mediante la sonda MitoSox™ (Kalyanaraman, Darley-Usmar et al. 2012) observamos un aumento en la fluorescencia de la sonda tanto en los fibroblastos del paciente PP2Cm como en los de BCKDK, siendo más notable en estos últimos. Dado que atendemos a lo que parecerían situaciones metabólicas opuestas, pensamos que el aumento que observamos en las especies reactivas de oxígeno podría ser el reflejo de procesos diferentes.

En pacientes MSUD se ha descrito un aumento en la generación de ROS, relacionado con la acumulación de metabolitos observada en dichos pacientes (Bridi, Araldi et al. 2003, Funchal, Latini et al. 2006, Mc Guire, Parikh et al. 2009). El origen de este aumento de ROS no está claro, pero podría estar relacionado con la inhibición de complejos respiratorios por los propios metabolitos acumulados (Sitta, Ribas et al. 2014), condición favorable para la generación de anión superóxido. Estudios en levadura han relacionado mutaciones en la subunidad DLD con incrementos en la producción de peróxido de hidrógeno (Vaubel, Rustin et al. 2011), no quedando claro tampoco el mecanismo molecular por el que esto ocurriría.

Una situación distinta es la que observamos en las células de los pacientes BCKDK. Y es que en este caso, el origen de las ROS podría ser la propia hiperactividad del complejo BCKDH, que, ante la ausencia de regulador negativo, se ve incrementada. Tradicionalmente se ha identificado a los complejos de la cadena transportadora de electrones (CTE) como las principales fuentes de ROS (Boveris, Cadenas et al. 1976, Cadenas, Boveris et al. 1977, Chen, Vazquez et al. 2003), que transferirían un electrón al O_2 en vez de a su aceptor normal en determinadas condiciones energéticas, generándose $O_2^{\cdot -}$. En los últimos años se ha acumulado cuerpo de evidencia que sugiere que la subunidad E3 de los complejos oxoácidos deshidrogenasa mitocondriales, en una situación energética de elevado ratio NADH/NAD⁺, podría ser la fuente principal de ROS en la mitocondria (Adam-Vizi 2005, Adam-Vizi and Tretter 2013). Estos complejos contienen una flavina que se encontrará reducida en una razón NADH/NAD⁺ elevada, que reducirá al oxígeno generando anión superóxido (Starkov, Fiskum et al. 2004, Tretter and Adam-Vizi 2004, Quinlan, Goncalves et al. 2014). En los pacientes BCKDK demostramos una alta actividad del complejo deshidrogenasa, que genera NADH en la reacción de descarboxilación de los α -cetoácidos, con lo que sospechamos que el aumento en $O_2^{\cdot -}$ podría provenir de dicha hiperactividad.

Considerando las hipótesis de que el aumento en la producción de ROS fuese reflejo de una disminución en la presencia de enzimas antioxidantes, responsables del metabolismo de las especies reactivas de oxígeno para detoxificar a la célula (Pedersen, Zolkipli et al. 2010), hemos valorado la expresión de las enzimas MnSOD y GPX (Holley, Bakthavatchalu et al. 2011, Venditti, Di Stefano et al. 2013). Nuestros resultados mostraban una respuesta antioxidante compleja, con un incremento en la expresión de MnSOD solo en el paciente P.BCKDK_2 como posible reflejo de una respuesta de defensa

antioxidante mitocondrial frente a los efectos dañinos del incremento en ROS. Para el resto de los fibroblastos y condiciones metabólicas no pudo constatarse tal respuesta.

Niveles aumentados en las especies reactivas de oxígeno pueden afectar a la función celular y mitocondrial (Kirkinezos and Moraes 2001, Bolisetty and Jaimes 2013). Así, vistos los aumentos en ROS, nos planteamos cómo estaría alterada, en las condiciones de desregulación del metabolismo de los BCAA, la función respiratoria mitocondrial. Para ello valoramos la tasa de consumo de oxígeno en distintas situaciones de los fibroblastos y la repercusión sobre la síntesis total de ATP. Aunque por el orden de la presentación de los resultados se ha mostrado el incremento en las especies reactivas de oxígeno y el desacoplamiento de la respiración mitocondrial de la producción de ATP como una relación de causalidad simple, lo cierto es que se ha descrito cómo este desacoplamiento lleva a un incremento en la producción de ROS, formándose un ciclo vicioso (Zorov, Juhaszova et al. 2006) en el que ambos elementos (el aumento en anión superóxido y la disfunción respiratoria) podrían ser causa y consecuencia parciales de la disfunción del otro.

Al **valorar la tasa de consumo de oxígeno**, observamos que tanto los pacientes BCKDK como PP2Cm mostraban las tasas de respiración basal y sensible a oligomicina disminuidas. Esto es, que sus mitocondrias consumían menos oxígeno y tenían la fracción de consumo de dicho oxígeno acoplada a la síntesis de ATP reducida frente a los fibroblastos control. Esta bajada en la respiración ligada a la síntesis de ATP era más acusada en los pacientes BCKDK, que además mostraban mayores incrementos en la generación de ROS. La deficiencia en la capacidad OXPHOS de las células estaba afectando a la síntesis final de ATP, conclusión a la que llegamos observada la reducción en la concentración de ATP celular total.

El aumento en las concentraciones de BCAAs y BCKAs se ha relacionado con un posible daño directo de las mitocondrias, otorgándole un rol en el daño neurológico observado en pacientes de MSUD (Bridi, Araldi et al. 2003, Sgaravatti, Rosa et al. 2003, Funchal, Latini et al. 2006, Amaral, Leipnitz et al. 2010). Observada la variación en la respiración mitocondrial en los fibroblastos de PP2Cm, nos planteamos el papel que estaban jugando en esta los metabolitos o la propia ausencia de la fosfatasa. De esta manera, valoramos el perfil de consumo de oxígeno en las mismas condiciones en muestras de otros pacientes diagnosticados como Jarabe de Arce, modelos naturales en los que observábamos un aumento en las concentraciones de BCAAs. Concretamente valoramos la función respiratoria en fibroblastos de un paciente con una presentación variante de la enfermedad (con metabolitos al diagnóstico en rangos similares al paciente PP2Cm) y en fibroblastos de un paciente diagnosticado como una forma clásica de MSUD, con grandes incrementos en las concentraciones de BCAAs y BCKAs. Para nuestra sorpresa, el paciente con menor capacidad catalítica de los BCAAs presentaba mejor función mitocondrial que el variante, mostrando incluso una capacidad respiratoria máxima incrementada frente a fibroblastos control. Analizamos también estos parámetros en fibroblastos del paciente BCATm, modelo natural que tendría niveles aumentados de BCAAs pero normales de BCKAs. Observamos un perfil de consumo de oxígeno disminuido en todos los parámetros analizados respecto a los controles, demostrando una menor capacidad de respiración acoplada a la síntesis de ATP. Estos

resultados indicarían que la relación entre BCAAs y BCKAs e inhibición de la respiración mitocondrial no sería una relación de causalidad simple ni directa, sino que probablemente se vea influenciada por el estado del metabolismo energético general de la célula. Esto hace que las variaciones que se observan en cada caso sean muy posiblemente dependientes en gran medida del fondo genético de cada paciente y por tanto, de su capacidad de responder ante los cambios en el medio.

Precisamente para atender a las particularidades de la deficiencia en cada enzima más allá del control de metabolitos y entender la patofisiología en cada contexto genético, analizamos cómo la ausencia de cada proteína reguladora afectaba a la función mitocondrial o cómo la mitocondria estaba reaccionando en cada caso a las alteraciones descritas.

2.2| Ausencia de proteína PP2Cm en humanos: ¿algo más que la desregulación de BCKDH?

La proteína PP2Cm pertenece a la superfamilia PPM (protein phosphatase magnesium/ manganium-dependent), una de las tres superfamilias de serin/treonín fosfatasas existentes, clasificadas basándose en su secuencia y estructura. De esta familia se conocen al menos 18 miembros, entre los que se encuentran las fosfatasas del complejo PDH (PDP1 y PDP2) y PP2Cm. Se han relacionado con la regulación de las cascadas de señalización de estrés, metabolismo celular y señalización para la muerte/ supervivencia, entre otras (Lu and Wang 2008).

Esta fosfatasa está altamente expresada en músculo cardíaco y sistema nervioso central (Lu, Ren et al. 2007), y su expresión en corazón está regulada por estrés, viéndose reducida en corazones hipertróficos y dañados. En pez cebra se demostró que se producía una pérdida de contractibilidad cardíaca de una manera dosis dependiente ante la ausencia de expresión de PP2Cm, y en ratones se observó una aceleración en el desarrollo de fallo cardíaco tras realizar una constricción transaórtica, lo que sugiere que la pérdida de PP2Cm no es simplemente una consecuencia del fallo cardíaco sino que juega un papel importante como contribuyente en el desarrollo del fallo (Sun, Lu et al. 2011).

Aunque los mecanismos moleculares que relacionan la ausencia de PP2Cm con los problemas cardíacos y de desarrollo en los modelos estudiados no están suficientemente claros, se han propuesto distintas hipótesis, que van desde el efecto de los propios aminoácidos sobre el metabolismo y función mitocondrial, a la identificación de PP2Cm como un elemento clave en la mitocondria y supervivencia celular. La relación de esta fosfatasa con la función mitocondrial se estableció a partir de la observación de un aumento de la sensibilidad al calcio de las mitocondrias PP2Cm deficientes (Lu, Ren et al. 2007), relacionándola con la transición de permeabilidad mitocondrial.

La **transición de permeabilidad mitocondrial** es un fenómeno caracterizado por la pérdida repentina del potencial de membrana mitocondrial (Zorov, Juhaszova et al. 2009). La entidad responsable de

este proceso es el poro de transición mitocondrial (mPTP), y su inducción causa el tráfico no selectivo entre mitocondria y citosol de partículas pequeñas cargadas, agua y moléculas de hasta 1,5 kDa. La naturaleza exacta de este complejo no está definida (Wallace and Fan 2009, Zorov, Juhaszova et al. 2009, Varanyuwatana and Halestrap 2012), pero se ha propuesto que la formación y “apertura” del poro refleja otra función de un conjunto de proteínas ante un ambiente patológico que tendrían otros papeles principales en la biología mitocondrial en condiciones fisiológicas (Duchen 2000).

109

Se ha descrito la sobrecarga de calcio como inductor importante de la formación del mPTP (Lemasters, Theruvath et al. 2009). Por ello, valoramos la capacidad de retención de calcio (CRC) de células permeabilizadas de paciente y controles para identificar posibles incrementos en la sensibilidad a calcio. Nuestros resultados, por el contrario, fueron poco reproducibles, con experimentos en los que las células deficientes en PP2Cm mostraban una alta sensibilidad a calcio (CRCs muy disminuidas) y otros con CRCs similares a las detectadas en fibroblastos control.

De estos experimentos, no obstante, no se puede concluir que en humanos la PP2Cm no tenga el papel que se le ha asignado en células de pez cebra y ratón. De hecho y dada la expresión diferencial de PP2Cm en tejidos, no es descartable un papel mucho más preponderante de la proteína en células con mayor metabolismo oxidativo que los fibroblastos, como los cardiomiocitos. Aunque en detrimento de esta hipótesis hemos de reseñar que el paciente no ha desarrollado hasta la fecha ninguna patología cardíaca que nos conste, no podemos olvidar que ha estado en tratamiento desde el nacimiento limitando su exposición a los BCAAs, y posiblemente modificando así el curso natural de la patología.

La familia PP2C ha sido relacionada con la modulación de las rutas proapoptóticas MAPK, otorgándolas papeles importantes y específicos en la regulación de la respuesta al estrés. Las vías MAPK (mitogen-activated protein kinases) son vías de señalización que integran y procesan varias señales extracelulares, siendo elementos esenciales en el circuito de señalización intracelular (Kumar, Boehm et al. 2003). Hasta la fecha se han descrito tres vías MAPK principales, conservadas desde las levaduras hasta los humanos: ERK, JNK y p38. Las tres son vías de señalización por cascadas de fosforilación de quinasas, que aglutinan varias isoformas con, frecuentemente, diferentes funciones. En general, la vía ERK responde a estímulos mitogénicos y proliferativos, mientras que JNK y p38 responden a estrés ambiental (Kyriakis and Avruch 2001, Pearson, Robinson et al. 2001). Para PP2Cm concretamente se describió una activación de las vías proapoptóticas p38 y JNK. En los fibroblastos del paciente PP2Cm observamos una activación de ambas rutas, sin activación de la ruta ERK, que no registramos en fibroblastos de otros pacientes MSUD o controles.

El estudio de la activación de las rutas MAPK se complementó con los resultados que obtuvimos en el [array de expresión de genes relacionados con la apoptosis](#), en el que analizamos la expresión de 84 genes descritos como implicados en la apoptosis. Observamos un aumento en la expresión de algunos genes proapoptóticos, como *TNFRSF10B*, *BCL2* o *BNIP3*, y disminución en la expresión de otros antiapoptóticos, como *BCL2L1* o *BIRC3*. Aunque preliminar, este análisis revalida lo observado en el

estudio de las rutas MAPK, confirmando un aparente incremento en la susceptibilidad a la apoptosis en las células deficientes de PP2Cm. Serán necesarios estudios de expresión al nivel proteico para complementar los resultados obtenidos en el array de RNA.

Con todo esto, podríamos concluir que aparentemente la proteína fosfatasa tiene más funciones en humanos que la de regular el complejo BCKDH. Será por tanto necesario analizar el efecto de su falta de funcionalidad sobre otros tipos celulares y/o bajo condiciones metabólicas adversas (respuesta a estrés entre otras).

2.3 | Ausencia de proteína BCKDK en humanos: respuesta mitocondrial

Como hemos indicado a lo largo de este trabajo, uno de los aspectos más llamativos de la expresión fenotípica de la ausencia de BCKDK era la sintomatología clínica que propició un diagnóstico para nuestros pacientes y los previamente descritos en (Novarino, El-Fishawy et al. 2012) como pacientes autistas. El Síndrome de Espectro Autista (ASD) agrupa un grupo muy amplio de patologías que afectan al desarrollo neurológico y que tradicionalmente se encuadran como alteraciones de comportamiento sin etiología clara. La nueva revolución genómica está identificando nuevas causas genéticas para el autismo, como la descrita en los pacientes BCKDK, y evidenciando la implicación de algunos de estos genes en un número limitado de rutas moleculares cuya caracterización podría convertirlos en dianas accionables para el tratamiento (Geschwind and State 2015).

Precisamente en este proceso de identificación de rutas que pudieran contribuir al fenotipo neurológico de los pacientes BCKDK, los primeros datos aportados por la Dra. Novarino y colaboradores (Novarino, El-Fishawy et al. 2012), analizando el patrón de expresión génica en corteza de cerebro de ratones *Bckdk*^{-/-} e identificando alteraciones en la expresión de varios transportadores de aminoácidos, incluido LAT1 (SLC7A5/SLC3A2), permitió concluir que también aquí, como en MSUD, un desequilibrio en la concentración de aminoácidos precursores de neurotransmisores podría contribuir al fenotipo neurológico de los pacientes.

Ahora bien, y puesto que en las últimas décadas se ha establecido una relación entre el autismo y las disfunciones en la producción de energía más allá de la disfunción específica del cerebro (Rose, Frye et al. 2014, Streck, Goncalves et al. 2014), también aquí nuestra investigación se centró en la exploración de la función mitocondrial y los cambios dinámicos en respuesta al daño oxidativo que podrían subyacer a la patología, aprovechando una vez más el modelo natural que nos aportan las propias células de los pacientes.

La mitocondria es un orgánulo dinámico que cambia de forma según las necesidades energéticas de la célula (Liesa and Shirihai 2013). Concretamente, se ha descrito como las mitocondrias responden con su forma a la función, que incluyen la fosforilación oxidativa y la generación y regulación de las

especies reactivas de oxígeno (Vafai and Mootha 2012). Así, mediante una maquinaria que controla la dinámica mitocondrial, la red mitocondrial alternará entre el continuo de estados desde la hiperfusión a la fragmentación (Wai and Langer 2016). En este punto, completamos el estudio de la respuesta de la mitocondria a la alteración metabólica mediante el [análisis de la forma de las mitocondrias por microscopía electrónica de transmisión](#). Este reveló que las mitocondrias de los pacientes BCKDK tenían una forma más alargada y tubular, mostrando aumentada frente a los controles la relación entre el eje mayor y el eje menor de la hipotética elipse que constituiría la mitocondria. Para evaluar la capacidad de respuesta de las mitocondrias de fibroblastos humanos a un cambio en el entorno pro-oxidativo las células se crecieron en presencia de galactosa, observamos que únicamente las mitocondrias de los fibroblastos control reaccionaron en un reajuste morfológico al nuevo ambiente, adquiriendo una forma más tubular, mientras que las de los pacientes se mantuvieron sin alteraciones. Verificamos así que la condición bioenergética estaba afectando a la dinámica mitocondrial en los fibroblastos en cultivo, y que por lo tanto los cambios detectados en la longitud de la mitocondrias de pacientes BCKDK podrían reflejar un desajuste entre los eventos de fisión y fusión mitocondrial.

111

En mamíferos, la fusión mitocondrial requiere la interacción de las mitofusinas de membrana externa mitocondrial Mfn1 y Mfn2 con la proteína de la familia de las dinaminas GTPasas OPA1, que localizada en la membrana interna, se presenta con dos isoformas, una larga y una corta. Recientemente se ha descrito el procesamiento proteolítico de OPA1 como un evento pro-fusión (Mishra, Carelli et al. 2014), que además es estrictamente dependiente de los niveles de ATP, aumentando el procesamiento cuando estos caen (Baricault, Segui et al. 2007). Al analizar la expresión de esta proteína en los pacientes BCKDK crecidos en glucosa o galactosa observamos que mostraban en condiciones normales un incremento en el procesamiento de OPA1 frente a los controles. Los fibroblastos control, por su parte, mostraban un aumento en el procesamiento al crecer en condiciones oxidativas (galactosa), tal y como observábamos en el análisis de la ultraestructura. Así pues, los datos corroboran resultados previos: en condiciones OXPHOS aumentadas registramos un aumento en el procesamiento proteolítico de OPA1, acompañado de un alargamiento mitocondrial.

El análisis de la proteína mitofusina 2 (Mfn2) reveló un aumento en la expresión de la proteína no estadísticamente significativo. Para la proteína Mfn2, además de su papel necesario en el proceso de fusión, se ha descrito una implicación como modulador del metabolismo mitocondrial (Mourier, Motori et al. 2015, Zorzano, Hernandez-Alvarez et al. 2015) y en el acoplamiento mitocondria-retículo endoplasmático (Filadi, Greotti et al. 2015).

A lo largo del trabajo hemos observado diferencias entre los dos pacientes BCKDK. Pero debemos entender en este punto que, al trabajar en modelos KO naturales, estamos estudiando el efecto de la mutación en un contexto o fondo genético, que puede modular el efecto de la propia mutación. Así, al analizar la capacidad de respiración de reserva del paciente BCKDK_1 (portador de una mutación de pérdida de función y con peor estado clínico) observábamos que este paciente superaba a los controles, contrastando con el perfil respiratorio disminuido que registrábamos en el paciente BCKDK_2. Pensamos que esta diferencia se debe precisamente al fondo genético de ambos pacientes,

confiriendo al primero una capacidad de reacción que no encontramos en el segundo.

112

A fin de poder analizar cuál era el perfil respiratorio “típico” asociado a un defecto en BCKDK, aislándolo de los diferentes fondos genéticos de nuestros modelos KO naturales, interferimos mediante shRNA la expresión de BCKDK. Analizamos en estos controles el perfil de consumo de oxígeno y la morfología mitocondrial, observando una respiración similar a la registrada en el paciente BCKDK_2, sin capacidad de reserva y con reducciones en las respiraciones basal y sensible a oligomicina. El análisis de la morfología ratificó lo observado en los fibroblastos de los pacientes, mostrando una elongación y aspecto tubular de las mitocondrias.

En todos los casos tratados nos encontramos ante enfermedades eminentemente neurometabólicas. En la patofisiología de la enfermedad están contribuyendo, posiblemente, la disfunción bioenergética descrita y el efecto sobre la neurotransmisión de los desbalances en los niveles de BCAA. Aún no siendo células que dependan fundamentalmente de la función mitocondrial, hemos trabajado en fibroblastos primarios de los pacientes, por ser el modelo natural del que disponíamos. Es por tanto esperable que los defectos observados tengan un impacto mucho más severo en otros tejidos como el neuronal. En este tejido, además, los aminoácidos ramificados son elementales en el control de los niveles del neurotransmisor glutamato, ya que la transferencia neta del grupo amino de los BCAA al α KG formando glutamato no ocurre hasta que los BCKA son irreversiblemente descarboxilados por el complejo BCKDH (Cole, Sweatt et al. 2012). En el caso de los pacientes MSUD y BCATm, que no llegaron a debutar clínicamente por detectarse en programas de cribado neonatal, el aumento en los niveles de BCAA llevaría a una disminución en la concentración de Glu, amén del posible transporte de otros aminoácidos precursores de otros neurotransmisores, por competición en el transporte por la barrera hematoencefálica, según se ha descrito en la literatura existente. En el caso de la ausencia de BCKDK, por contrario, el estado observado sería un aumento en la concentración de glutamato, de tal manera que el proceso de excitotoxicidad podría ser responsable del autismo y retraso psicomotor observado. En este caso, la transferencia de nitrógeno estará consecuentemente incrementada, manifestándose en una disminución en las concentraciones de BCAA y de α -cetoglutarato, corroborada al analizar el perfil de metabolitos en el medio de cultivo de fibroblastos de pacientes y controles por MS/MS.

Los resultados aquí discutidos ponen de relieve la importancia del equilibrio en la regulación del catabolismo de los BCAA. Dado que estos son elementos clave en el mantenimiento de los *pools* intracelulares de acetil-CoA no podemos descartar un mecanismo de reprogramación celular para adaptarse a las variaciones.

La descripción de nuevos genes implicados en una ruta metabólica amplía el conocimiento de la propia ruta, y permite abrir nuevas dianas de acción terapéutica para los pacientes, que atiendan a la disfunción mitocondrial en complemento con la descompensación metabólica.

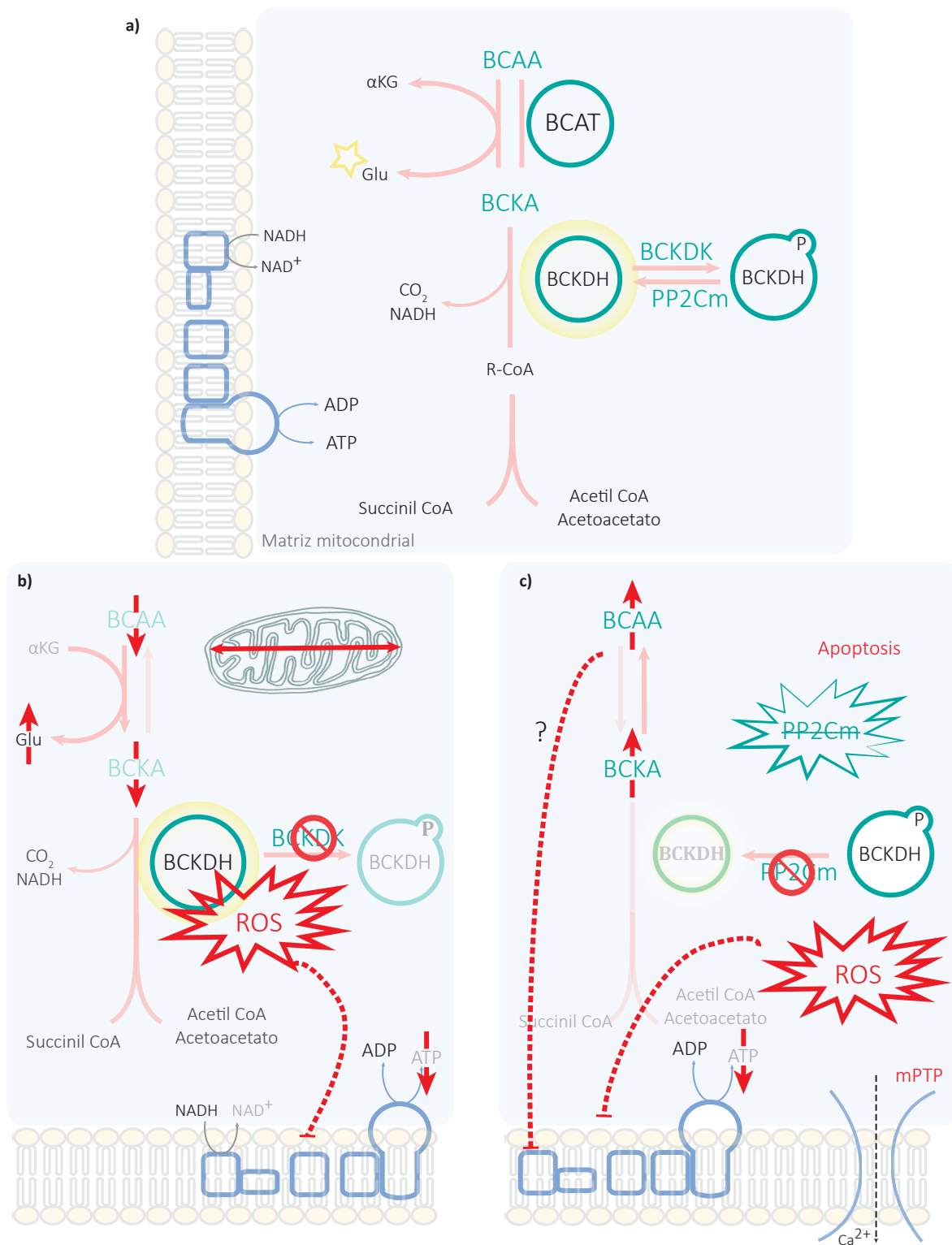


Figura 29_ Resumen del efecto de la ausencia de las proteínas reguladoras: Resumen del efecto de la ausencia de las proteínas reguladoras, comparadas con una situación normal (**a**). **b)** La ausencia de BCKDK lleva al hipercatabolismo de los BCAA, situación en la que la subunidad E3 del complejo BCKDH podría estar actuando como fuente de ROS. Se observa deficiencia en la respiración mitocondrial y elongación de las mitocondrias. **c)** Ante la ausencia de PP2Cm también se observa un incremento en la producción de ROS y una disfunción mitocondrial, aunque posiblemente por el efecto combinado del incremento en BCAAs y de funciones de la proteína accesorias a la regulación del complejo BCKDH. Se observa un incremento en la expresión de genes pro-apoptóticos y activación de las vías MAPK. Aunque observamos efectos similares sobre la célula, pueden estar siendo causados por caminos diferentes.

6 CONCLUSIONES



- 1 La correcta estratificación clínica y bioquímica resulta esencial para dirigir el diagnóstico genético. Este diagnóstico en muchos casos no es más que el comienzo de un proceso de investigación sobre el estudio funcional.
- 2 La proteína PP2Cm es la fosfatasa responsable de la regulación por defosforilación del complejo BCKDH en humanos. Mutaciones en el gen que la codifica (*PPM1K*), resultan en la aparición de un fenotipo clínicamente similar a las formas variantes de Jarabe de Arce.
- 3 Las disminuciones en aminoácidos ramificados y sus respectivos cetoácidos en fluidos biológicos constituyen una firma metabólica para defectos en BCKDK, que cursa con un perfil clínico inesperado que incluye microcefalia y alteraciones de comportamiento de tipo autista.
- 4 Las dos condiciones metabólicas resultantes de la desregulación del complejo BCKDH parecen asociarse a un daño mitocondrial. Los mecanismos moleculares que llevan a dicho estado podrían ser distintos en cada situación.
- 5 Los defectos encontrados en los fibroblastos con ausencia de PP2Cm no parecen solo relacionados con las concentraciones de BCAAs como por la deficiencia en la fosfatasa *per se*, ratificando un papel importante en la mitocondria y aún por concretar para PP2Cm en humanos.
- 6 Los defectos encontrados en los fibroblastos con ausencia de BCKDK si que parecen relacionados con la hiperactividad del complejo BCKDH o la disminución en la concentración de BCAAs, otorgando a la quinasa un papel central en la regulación del metabolismo de los aminoácidos ramificados.
- 7 Asociada a la deficiencia en BCKDK se observa una respuesta mitocondrial, posiblemente dirigida a limitar el daño mediante la modificación de la morfología y función de la red mitocondrial.
- 8 Se observan diferencias fenotípicas entre los pacientes presentados, lo que apoya la importancia del fondo genético de cada paciente en el desarrollo de la patología.
- 9 La implementación del correcto diagnóstico es una herramienta valiosa para entender las bases de la patología molecular, cuyo estudio permite la búsqueda de rutas de patogenia accionables sobre las que modificar la historia natural de la enfermedad.
- 10 Los presentes estudios han permitido establecer una opción terapéutica en los pacientes, ratificando la ya implementada en el caso de la deficiencia en PP2Cm, tratada como una forma variante de Jarabe de Arce, y permitiendo el diseño de una específica para los pacientes BCKDK, a día de hoy basada en el restablecimiento de los niveles de BCAA en fluido mediante un incremento en su ingesta.

7 BIBLIOGRAFÍA



- Abiri, M., R. Karamzadeh, M. Karimipoor, S. Ghadami, M. R. Alaei, S. D. Bagheri, H. Bagherian, A. Setoodeh, M. R. Noori-Daloi and Z. Sirous (2016). "Identification of six novel mutations in Iranian patients with maple syrup urine disease and their in silico analysis." *Mutat Res* 786: 34-40.
- Adam-Vizi, V. (2005). "Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources." *Antioxid Redox Signal* 7(9-10): 1140-1149.
- Adam-Vizi, V. and L. Tretter (2013). "The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress." *Neurochem Int* 62(5): 757-763.
- Adeva, M. M., J. Calvino, G. Souto and C. Donapetry (2012). "Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans." *Amino Acids* 43(1): 171-181.
- Alkuraya, F. S. (2015). "Human knockout research: new horizons and opportunities." *Trends Genet* 31(2): 108-115.
- Alkuraya, F. S. (2015). "Natural human knockouts and the era of genotype to phenotype." *Genome Med* 7(1): 48.
- Amaral, A. U., G. Leipnitz, C. G. Fernandes, B. Seminotti, P. F. Schuck and M. Wajner (2010). "Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain." *Brain Res* 1324: 75-84.
- Bahlo, M., R. Tankard, V. Lukic, K. L. Oliver and K. R. Smith (2014). "Using familial information for variant filtering in high-throughput sequencing studies." *Hum Genet* 133(11): 1331-1341.
- Baker, P. R., 2nd, M. W. Friederich, M. A. Swanson, T. Shaikh, K. Bhattacharya, G. H. Scharer, J. Aicher, G. Creadon-Swindell, E. Geiger, K. N. MacLean, W. T. Lee, C. Deshpande, M. L. Freckmann, L. Y. Shih, M. Wasserstein, M. B. Rasmussen, A. M. Lund, P. Procopis, J. M. Cameron, B. H. Robinson, G. K. Brown, R. M. Brown, A. G. Compton, C. L. Dieckmann, R. Collard, C. R. Coughlin, 2nd, E. Spector, M. F. Wempe and J. L. Van Hove (2014). "Variant non ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5." *Brain* 137(Pt 2): 366-379.
- Baricault, L., B. Segui, L. Guegand, A. Olichon, A. Valette, F. Larminat and G. Lenaers (2007). "OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals." *Exp Cell Res* 313(17): 3800-3808.
- Bashyam, M. D., A. K. Chaudhary, M. Sinha, H. A. Nagarajaram, A. R. Devi, L. Bashyam, E. C. Reddy and A. Dalal (2012). "Molecular genetic analysis of MSUD from India reveals mutations causing altered protein truncation affecting the C-termini of E1alpha and E1beta." *J Cell Biochem* 113(10): 3122-3132.
- Bixel, M. G., J. Engelmann, W. Willker, B. Hamprecht and D. Leibfritz (2004). "Metabolism of [U-(13)C]leucine in cultured astroglial cells." *Neurochem Res* 29(11): 2057-2067.
- Bixel, M. G., S. M. Hutson and B. Hamprecht (1997). "Cellular distribution of branched-chain amino acid aminotransferase isoenzymes among rat brain glial cells in culture." *J Histochem Cytochem* 45(5): 685-694.
- Bolisetty, S. and E. A. Jaimes (2013). "Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology." *Int J Mol Sci* 14(3): 6306-6344.

- Borquez, D. A., P. J. Urrutia, C. Wilson, B. van Zundert, M. T. Nunez and C. Gonzalez-Billault (2016). "Dissecting the role of redox signaling in neuronal development." *J Neurochem*.
- Boveris, A., E. Cadenas and A. O. Stoppani (1976). "Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide." *Biochem J* 156(2): 435-444.
- Bridi, R., J. Araldi, M. B. Sgarbi, C. G. Testa, K. Durigon, M. Wajner and C. S. Dutra-Filho (2003). "Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease." *Int J Dev Neurosci* 21(6): 327-332.
- Brosnan, J. T. and M. E. Brosnan (2006). "Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation." *J Nutr* 136(1 Suppl): 207S-211S.
- Brunetti-Pierri, N., B. Lanpher, A. Erez, E. A. Ananieva, M. Islam, J. C. Marini, Q. Sun, C. Yu, M. Hegde, J. Li, R. M. Wynn, D. T. Chuang, S. Hutson and B. Lee (2011). "Phenylbutyrate therapy for maple syrup urine disease." *Hum Mol Genet* 20(4): 631-640.
- Brusque, A. M., R. Borba Rosa, P. F. Schuck, K. B. Dalcin, C. A. Ribeiro, C. G. Silva, C. M. Wannmacher, C. S. Dutra-Filho, A. T. Wyse, P. Briones and M. Wajner (2002). "Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid." *Neurochem Int* 40(7): 593-601.
- Bunik, V. I. and C. Sievers (2002). "Inactivation of the 2-oxo acid dehydrogenase complexes upon generation of intrinsic radical species." *Eur J Biochem* 269(20): 5004-5015.
- Burrage, L. C., S. C. Nagamani, P. M. Campeau and B. H. Lee (2014). "Branched-chain amino acid metabolism: from rare Mendelian diseases to more common disorders." *Hum Mol Genet* 23(R1): R1-8.
- Cadenas, E., A. Boveris, C. I. Ragan and A. O. Stoppani (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." *Arch Biochem Biophys* 180(2): 248-257.
- Carrozzo, R., D. Verrigni, M. Rasmussen, R. de Coo, H. Amartino, M. Bianchi, D. Buhas, S. Mesli, K. Naess, A. P. Born, B. Woldseth, P. Prontera, M. Batbayli, K. Ravn, F. Joensen, D. M. Cordelli, F. M. Santorelli, M. Tulinius, N. Darin, M. Duno, P. Jouvencel, A. Burlina, G. Stangoni, E. Bertini, I. Redonnet-Vernhet, F. Wibrand, C. Dionisi-Vici, J. Uusimaa, P. Vieira, A. N. Osorio, R. McFarland, R. W. Taylor, E. Holme and E. Ostergaard (2016). "Succinate-CoA ligase deficiency due to mutations in SUCLA2 and SUCLG1: phenotype and genotype correlations in 71 patients." *J Inher Metab Dis* 39(2): 243-252.
- Chance, B., H. Sies and A. Boveris (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." *Physiol Rev* 59(3): 527-605.
- Chen, Q., E. J. Vazquez, S. Moghaddas, C. L. Hoppel and E. J. Lesnefsky (2003). "Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III." *J Biol Chem* 278(38): 36027-36031.
- Christensen, K. D., D. Dukhovny, U. Siebert and R. C. Green (2015). "Assessing the Costs and Cost-Effectiveness of Genomic Sequencing." *J Pers Med* 5(4): 470-486.
- Chuang, D. T., J. L. Chuang and R. M. Wynn (2006). "Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism." *J Nutr* 136(1 Suppl): 243S-249S.
- Chuang, D.T., Shih, V.E. (2001). "Maple syrup urine disease". In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic & molecular bases of inherited disease*, 8e. New York, NY: McGrawHill. p.1971-2006
- Clark, J. B. and J. M. Land (1974). "Differential effects of 2-oxo acids on pyruvate utilization and fatty acid synthesis in rat brain." *Biochem J* 140(1): 25-29.

- Cole, J. T., A. J. Sweatt and S. M. Hutson (2012). "Expression of mitochondrial branched-chain aminotransferase and alpha-keto-acid dehydrogenase in rat brain: implications for neurotransmitter metabolism." *Front Neuroanat* 6: 18.
- Cottrell, C. E., J. Mendell, M. Hart-Kothari, D. Ell, D. L. Thrush, C. Astbury, M. Pastore, J. M. Gastier-Foster and R. E. Pyatt (2012). "Maternal uniparental disomy of chromosome 4 in a patient with limb-girdle muscular dystrophy 2E confirmed by SNP array technology." *Clin Genet* 81(6): 578-583.
- Couce, M. L., F. Ramos, M. A. Bueno, J. Diaz, S. Meavilla, M. D. Boveda, A. Fernandez-Marmiesse and A. Garcia-Cazorla (2015). "Evolution of maple syrup urine disease in patients diagnosed by newborn screening versus late diagnosis." *Eur J Paediatr Neurol* 19(6): 652-659.
- Couce Pico, M. L., D. E. Castineiras Ramos, M. D. Boveda Fontan, A. J. Iglesias Rodriguez, J. A. Cocho de Juan and J. M. Fraga Bermudez (2007). "[Advances in the diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: experience in Galicia (Spain)]." *An Pediatr (Barc)* 67(4): 337-343.
- Cogliati, S., J. A. Enriquez and L. Scorrano (2016). "Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality." *Trends Biochem Sci* 41(3): 261-273.
- Damuni, Z. and L. J. Reed (1987). "Purification and properties of the catalytic subunit of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase phosphatase from bovine kidney mitochondria." *J Biol Chem* 262(11): 5129-5132.
- Das, A. M. (2003). "Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease." *Mol Genet Metab* 79(2): 71-82.
- Davie, J. R., R. M. Wynn, M. Meng, Y. S. Huang, G. Aalund, D. T. Chuang and K. S. Lau (1995). "Expression and characterization of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase from the rat. Is it a histidine-protein kinase?" *J Biol Chem* 270(34): 19861-19867.
- Dello Russo, C., G. Di Giacomo, A. Mesoraca, L. D'Emidio, P. Iaconianni, E. Minutolo, A. Lippa and C. Giorlandino (2014). "Next generation sequencing in the identification of a rare genetic disease from preconceptional couple screening to preimplantation genetic diagnosis." *J Prenat Med* 8(1-2): 17-24.
- Diaz, V. M., C. Camarena, A. de la Vega, M. Martinez-Pardo, C. Diaz, M. Lopez, F. Hernandez, A. Andres and P. Jara (2014). "Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long-term follow-up." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59(5): 636-639.
- Dodd, K. M. and A. R. Tee (2012). "Leucine and mTORC1: a complex relationship." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(11): E1329-1342.
- Doering, C. B., C. Coursey, W. Spangler and D. J. Danner (1998). "Murine branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase; cDNA cloning, tissue distribution, and temporal expression during embryonic development." *Gene* 212(2): 213-219.
- Dolled-Filhart, M. P., M. Lee, Jr., C. W. Ou-Yang, R. R. Haraksingh and J. C. Lin (2013). "Computational and bioinformatics frameworks for next-generation whole exome and genome sequencing." *ScientificWorldJournal* 2013: 730210.
- Donovan, F. X., D. C. Kimble, Y. Kim, F. P. Lach, U. Harper, A. Kamat, M. Jones, E. M. Sanborn, R. Tryon, J. E. Wagner, M. L. MacMillan, E. A. Ostrander, A. D. Auerbach, A. Smogorzewska and S. C. Chandrasekharappa (2016). "Paternal or Maternal Uniparental Disomy of Chromosome 16 Resulting in Homozygosity of a Mutant Allele Causes Fanconi Anemia." *Hum Mutat*.

- Duchen, M. R. (2000). "Mitochondria and Ca(2+) in cell physiology and pathophysiology." *Cell Calcium* 28(5-6): 339-348.
- Eccleston, J. L., C. Koh, T. C. Markello, W. A. Gahl and T. Heller (2012). "An apparent homozygous deletion in maltase-glucoamylase, a lesson in the evolution of SNP arrays." *Mol Genet Metab* 107(4): 674-678.
- Fato, R., C. Bergamini, S. Leoni, P. Strocchi and G. Lenaz (2008). "Generation of reactive oxygen species by mitochondrial complex I: implications in neurodegeneration." *Neurochem Res* 33(12): 2487-2501.
- Fernandez-Guerra, P., R. Navarrete, K. Weisiger, L. R. Desviat, S. Packman, M. Ugarte and P. Rodriguez-Pombo (2010). "Functional characterization of the novel intronic nucleotide change c.288+9C>T within the BCKDHA gene: understanding a variant presentation of maple syrup urine disease." *J Inherit Metab Dis* 33 Suppl 3: S191-198.
- Fernstrom, J. D. (2005). "Branched-chain amino acids and brain function." *J Nutr* 135(6 Suppl): 1539S-1546S.
- Ferrer, I., P. Ruiz-Sala, Y. Vicente, B. Merinero, C. Perez-Cerda and M. Ugarte (2007). "Separation and identification of plasma short-chain acylcarnitine isomers by HPLC/MS/MS for the differential diagnosis of fatty acid oxidation defects and organic acidemias." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 860(1): 121-126.
- Filadi, R., E. Greotti, G. Turacchio, A. Luini, T. Pozzan and P. Pizzo (2015). "Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(17): E2174-2181.
- Frezza, C., S. Cipolat, O. Martins de Brito, M. Micaroni, G. V. Beznoussenko, T. Rudka, D. Bartoli, R. S. Polishuck, N. N. Danial, B. De Strooper and L. Scorrano (2006). "OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion." *Cell* 126(1): 177-189.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
- Frye, R. E. and D. A. Rossignol (2014). "Treatments for biomedical abnormalities associated with autism spectrum disorder." *Front Pediatr* 2: 66.
- Funchal, C., A. Latini, M. C. Jacques-Silva, A. Q. Dos Santos, L. Buzin, C. Gottfried, M. Wajner and R. Pessoa-Pureur (2006). "Morphological alterations and induction of oxidative stress in glial cells caused by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease." *Neurochem Int* 49(7): 640-650.
- Garcia-Espinosa, M. A., R. Wallin, S. M. Hutson and A. J. Sweatt (2007). "Widespread neuronal expression of branched-chain aminotransferase in the CNS: implications for leucine/glutamate metabolism and for signaling by amino acids." *J Neurochem* 100(6): 1458-1468.
- Geschwind, D. H. and M. W. State (2015). "Gene hunting in autism spectrum disorder: on the path to precision medicine." *Lancet Neurol* 14(11): 1109-1120.
- Giesbertz, P. and H. Daniel (2016). "Branched-chain amino acids as biomarkers in diabetes." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 19(1): 48-54.
- Gomes, L. C., G. Di Benedetto and L. Scorrano (2011). "During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability." *Nat Cell Biol* 13(5): 589-598.

- Green, D. R., L. Galluzzi and G. Kroemer (2014). "Cell biology. Metabolic control of cell death." *Science* 345(6203): 1250256.
- Grimm, M., B. Calgeer, P. Teriete, T. Biegner, A. Munz and S. Reinert (2016). "Targeting thiamine-dependent enzymes for metabolic therapies in oral squamous cell carcinoma?" *Clin Transl Oncol* 18(2): 196-205.
- Guevara-Campos, J., L. Gonzalez-Guevara, C. Puig-Alcaraz and O. Cauli (2013). "Autism spectrum disorders associated to a deficiency of the enzymes of the mitochondrial respiratory chain." *Metab Brain Dis* 28(4): 605-612.
- Gupta, D., S. Bijarnia-Mahay, R. Saxena, S. Kohli, R. Dua-Puri, J. Verma, E. Thomas, Y. Shigematsu, S. Yamaguchi, R. Deb and I. C. Verma (2015). "Identification of mutations, genotype-phenotype correlation and prenatal diagnosis of maple syrup urine disease in Indian patients." *Eur J Med Genet* 58(9): 471-478.
- Halama, A., M. Horsch, G. Kastenmuller, G. Moller, P. Kumar, C. Prehn, H. Laumen, H. Hauner, M. Hrabe de Angelis, J. Beckers, K. Suhre and J. Adamski (2016). "Metabolic switch during adipogenesis: From branched chain amino acid catabolism to lipid synthesis." *Arch Biochem Biophys* 589: 93-107.
- Harper, A. E., R. H. Miller and K. P. Block (1984). "Branched-chain amino acid metabolism." *Annu Rev Nutr* 4: 409-454.
- Harris, R. A., M. Joshi and N. H. Jeoung (2004). "Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism." *Biochem Biophys Res Commun* 313(2): 391-396.
- Harris, R. A., R. Paxton and A. A. DePaoli-Roach (1982). "Inhibition of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase activity by alpha-chloroisocaproate." *J Biol Chem* 257(23): 13915-13918.
- Harris, R. A., K. M. Popov and Y. Zhao (1995). "Nutritional regulation of the protein kinases responsible for the phosphorylation of the alpha-ketoacid dehydrogenase complexes." *J Nutr* 125(6 Suppl): 1758S-1761S.
- He, F. and L. Zuo (2015). "Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Diseases." *Int J Mol Sci* 16(11): 27770-27780.
- Holley, A. K., V. Bakthavatchalu, J. M. Velez-Roman and D. K. St Clair (2011). "Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse." *Int J Mol Sci* 12(10): 7114-7162.
- Honda, K., K. Ono, T. Mori and H. Kochi (1991). "Both induction and activation of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex in primary-cultured rat hepatocytes by clofibrate." *J Biochem* 109(6): 822-827.
- Huang, Y. S. and D. T. Chuang (1999). "Down-regulation of rat mitochondrial branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase kinase gene expression by glucocorticoids." *Biochem J* 339 (Pt 3): 503-510.
- Hull, J., M. E. Hindy, P. G. Kehoe, K. Chalmers, S. Love and M. E. Conway (2012). "Distribution of the branched chain aminotransferase proteins in the human brain and their role in glutamate regulation." *J Neurochem* 123(6): 997-1009.
- Hutson, S. M., D. Berkich, P. Drown, B. Xu, M. Aschner and K. F. LaNoue (1998). "Role of branched-chain aminotransferase isoenzymes and gabapentin in neurotransmitter metabolism." *J Neurochem* 71(2): 863-874.
- Hutson, S. M., R. K. Bledsoe, T. R. Hall and P. A. Dawson (1995). "Cloning and expression of the mammalian cytosolic branched chain aminotransferase isoenzyme." *J Biol Chem* 270(51): 30344-30352.
- Hutson, S. M., E. Lieth and K. F. LaNoue (2001). "Function of leucine in excitatory neurotransmitter metabolism in the central nervous system." *J Nutr* 131(3): 846S-850S.

- Hutson, S. M., A. J. Sweatt and K. F. Lanoue (2005). "Branched-chain [corrected] amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes." *J Nutr* 135(6 Suppl): 1557S-1564S.
- Ishihara, A. and E. Koyama (1966). "Transamination of branched chain amino acids. I. Branched chain amino acids-alpha-ketoglutarate transaminase." *J Biochem* 59(2): 160-169.
- Ishihara, N., Y. Fujita, T. Oka and K. Mihara (2006). "Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1." *EMBO J* 25(13): 2966-2977.
- Islam, M. M., M. Nautiyal, R. M. Wynn, J. A. Mobley, D. T. Chuang and S. M. Hutson (2010). "Branched-chain amino acid metabolon: interaction of glutamate dehydrogenase with the mitochondrial branched-chain aminotransferase (BCATm)." *J Biol Chem* 285(1): 265-276.
- Islam, M. M., R. Wallin, R. M. Wynn, M. Conway, H. Fujii, J. A. Mobley, D. T. Chuang and S. M. Hutson (2007). "A novel branched-chain amino acid metabolon. Protein-protein interactions in a supramolecular complex." *J Biol Chem* 282(16): 11893-11903.
- Jaafar, N., A. Moleirinho, E. Kerkeni, K. Monastiri, H. Seboui, A. Amorim, M. J. Prata and S. Quental (2013). "Molecular characterization of maple syrup urine disease patients from Tunisia." *Gene* 517(1): 116-119.
- Jackson, R. H. and T. P. Singer (1983). "Inactivation of the 2-ketoglutarate and pyruvate dehydrogenase complexes of beef heart by branched chain keto acids." *J Biol Chem* 258(3): 1857-1865.
- Jewell, J. L. and K. L. Guan (2013). "Nutrient signaling to mTOR and cell growth." *Trends Biochem Sci* 38(5): 233-242.
- Jewell, J. L., R. C. Russell and K. L. Guan (2013). "Amino acid signalling upstream of mTOR." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(3): 133-139.
- Joshi, M., N. H. Jeoung, K. M. Popov and R. A. Harris (2007). "Identification of a novel PP2C-type mitochondrial phosphatase." *Biochem Biophys Res Commun* 356(1): 38-44.
- Joshi, M. A., N. H. Jeoung, M. Obayashi, E. M. Hattab, E. G. Brocken, E. A. Liechty, M. J. Kubek, K. M. Vatter, R. C. Wek and R. A. Harris (2006). "Impaired growth and neurological abnormalities in branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase-deficient mice." *Biochem J* 400(1): 153-162.
- Kalyanaraman, B., V. Darley-Usmar, K. J. Davies, P. A. Dennery, H. J. Forman, M. B. Grisham, G. E. Mann, K. Moore, L. J. Roberts, 2nd and H. Ischiropoulos (2012). "Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations." *Free Radic Biol Med* 52(1): 1-6.
- Kaminsky, V. O. and B. Zhivotovsky (2014). "Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis." *Antioxid Redox Signal* 21(1): 86-102.
- Khan, M. A., S. Mohan, M. Zubair and C. Windpassinger (2016). "Homozygosity mapping identified a novel protein truncating mutation (p.Ser100Leufs*24) of the BBS9 gene in a consanguineous Pakistani family with Bardet Biedl syndrome." *BMC Med Genet* 17(1): 10.
- Kell, D. B., M. Brown, H. M. Davey, W. B. Dunn, I. Spasic and S. G. Oliver (2005). "Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message." *Nat Rev Microbiol* 3(7): 557-565.
- Kim, O. Y., J. H. Lee and G. Sweeney (2013). "Metabolomic profiling as a useful tool for diagnosis and treatment of chronic disease: focus on obesity, diabetes and cardiovascular diseases." *Expert Rev Cardiovasc Ther* 11(1): 61-68.

- King, J. E., A. Dexter, I. Gadi, V. Zvereff, M. Martin, M. Bloom, A. Vanderver, A. Pizzino and J. L. Schmidt (2014). "Maternal uniparental isodisomy causing autosomal recessive GM1 gangliosidosis: a clinical report." *J Genet Couns* 23(5): 734-741.
- Kirkinezos, I. G. and C. T. Moraes (2001). "Reactive oxygen species and mitochondrial diseases." *Semin Cell Dev Biol* 12(6): 449-457.
- Kobayashi, R., Y. Shimomura, M. Otsuka, K. M. Popov and R. A. Harris (2000). "Experimental hyperthyroidism causes inactivation of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in rat liver." *Arch Biochem Biophys* 375(1): 55-61.
- Koboldt, D. C., K. M. Steinberg, D. E. Larson, R. K. Wilson and E. R. Mardis (2013). "The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics." *Cell* 155(1): 27-38.
- Kuhlenbaumer, G., J. Hullmann and S. Appenzeller (2011). "Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders." *Hum Mutat* 32(2): 144-151.
- Kumar, S., J. Boehm and J. C. Lee (2003). "p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases." *Nat Rev Drug Discov* 2(9): 717-726.
- Kumaran, S., M. S. Patel and F. Jordan (2013). "Nuclear magnetic resonance approaches in the study of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes--a literature review." *Molecules* 18(10): 11873-11903.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* 81(2): 807-869.
- LaNoue, K. F., D. A. Berkich, M. Conway, A. J. Barber, L. Y. Hu, C. Taylor and S. Hutson (2001). "Role of specific aminotransferases in de novo glutamate synthesis and redox shuttling in the retina." *J Neurosci Res* 66(5): 914-922.
- Lapunzina, P. and D. Monk (2011). "The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer." *Biol Cell* 103(7): 303-317.
- Legido, A., R. Jethva and M. J. Goldenthal (2013). "Mitochondrial dysfunction in autism." *Semin Pediatr Neurol* 20(3): 163-175.
- Lemasters, J. J., T. P. Theruvath, Z. Zhong and A. L. Nieminen (2009). "Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death." *Biochim Biophys Acta* 1787(11): 1395-1401.
- Li, F., Y. Yin, B. Tan, X. Kong and G. Wu (2011). "Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond." *Amino Acids* 41(5): 1185-1193.
- Li, J., R. M. Wynn, M. Machius, J. L. Chuang, S. Karthikeyan, D. R. Tomchick and D. T. Chuang (2004). "Cross-talk between thiamin diphosphate binding and phosphorylation loop conformation in human branched-chain alpha-keto acid decarboxylase/dehydrogenase." *J Biol Chem* 279(31): 32968-32978.
- Liesa, M. and O. S. Shirihai (2013). "Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure." *Cell Metab* 17(4): 491-506.
- Lohmann, K. and C. Klein (2014). "Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis." *Neurotherapeutics* 11(4): 699-707.
- Lu, G., S. Ren, P. Korge, J. Choi, Y. Dong, J. Weiss, C. Koehler, J. N. Chen and Y. Wang (2007). "A novel mitochondrial matrix serine/threonine protein phosphatase regulates the mitochondria permeability transition pore and is essential for cellular survival and development." *Genes Dev* 21(7): 784-796.
- Lu, G., H. Sun, P. Korge, C. M. Koehler, J. N. Weiss and Y. Wang (2009). "Functional characterization of a mitochondrial Ser/Thr protein phosphatase in cell death regulation." *Methods Enzymol* 457: 255-273.

- Lu, G., H. Sun, P. She, J. Y. Youn, S. Warburton, P. Ping, T. M. Vondriska, H. Cai, C. J. Lynch and Y. Wang (2009). "Protein phosphatase 2Cm is a critical regulator of branched-chain amino acid catabolism in mice and cultured cells." *J Clin Invest* 119(6): 1678-1687.
- Lu, G. and Y. Wang (2008). "Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: new tales from an old family." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(2): 107-112.
- Lu, J., G. Xie, W. Jia and W. Jia (2013). "Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids." *Front Med* 7(1): 53-59.
- Lynch, C. J. and S. H. Adams (2014). "Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance." *Nat Rev Endocrinol* 10(12): 723-736.
- Lynch, C. J., B. Halle, H. Fujii, T. C. Vary, R. Wallin, Z. Damuni and S. M. Hutson (2003). "Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(4): E854-863.
- Machius, M., J. L. Chuang, R. M. Wynn, D. R. Tomchick and D. T. Chuang (2001). "Structure of rat BCKD kinase: nucleotide-induced domain communication in a mitochondrial protein kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11218-11223.
- Maj, M. C., J. M. Cameron and B. H. Robinson (2006). "Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: orphan disease or an under-diagnosed condition?" *Mol Cell Endocrinol* 249(1-2): 1-9.
- Maj, M. C., N. MacKay, V. Levandovskiy, J. Addis, E. R. Baumgartner, M. R. Baumgartner, B. H. Robinson and J. M. Cameron (2005). "Pyruvate dehydrogenase phosphatase deficiency: identification of the first mutation in two brothers and restoration of activity by protein complementation." *J Clin Endocrinol Metab* 90(7): 4101-4107.
- Matsubara, K., N. Kataoka, S. Ogita, S. Sano, T. Ogata, M. Fukami and N. Katsumata (2014). "Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a CYP11B1 mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia: implication for a rare etiology of an autosomal recessive disorder." *Endocr J* 61(6): 629-633.
- Matsumoto, H., K. Akita, R. Sakai and Y. Shimomura (2010). "Analysis of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex activity in rat tissues using alpha-keto[1-13C] isocaproate as substrate." *Anal Biochem* 399(1): 1-6.
- Mayr, J. A., R. G. Feichtinger, F. Tort, A. Ribes and W. Sperl (2014). "Lipoic acid biosynthesis defects." *J Inherit Metab Dis* 37(4): 553-563.
- Mayr, J. A., F. A. Zimmermann, C. Fauth, C. Berghheim, D. Meierhofer, D. Radmayr, J. Zschocke, J. Koch and W. Sperl (2011). "Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation." *Am J Hum Genet* 89(6): 792-797.
- Mc Guire, P. J., A. Parikh and G. A. Diaz (2009). "Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism." *Mol Genet Metab* 98(1-2): 173-180.
- McLennan, H. R. and M. Degli Esposti (2000). "The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species." *J Bioenerg Biomembr* 32(2): 153-162.
- Menkes, J. H., P. L. Hurst and J. M. Craig (1954). "A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance." *Pediatrics* 14(5): 462-467.
- Mishra, P., V. Carelli, G. Manfredi and D. C. Chan (2014). "Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation." *Cell Metab* 19(4): 630-641.

- Morava, E., S. Rahman, V. Peters, M. R. Baumgartner, M. Patterson and J. Zschocke (2015). "Quo vadis: the re-definition of "inborn metabolic diseases"." *J Inher Metab Dis* 38(6): 1003-1006.
- Mourier, A., E. Motori, T. Brandt, M. Lagouge, I. Atanassov, A. Galinier, G. Rappl, S. Brodesser, K. Hultenby, C. Dieterich and N. G. Larsson (2015). "Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels." *J Cell Biol* 208(4): 429-442.
- Muelly, E. R., G. J. Moore, S. C. Bunce, J. Mack, D. C. Bigler, D. H. Morton and K. A. Strauss (2013). "Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease." *J Clin Invest* 123(4): 1809-1820.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* 417(1): 1-13.
- Nellis, M. M., A. Kasinski, M. Carlson, R. Allen, A. M. Schaefer, E. M. Schwartz and D. J. Daner (2003). "Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression." *Mol Genet Metab* 80(1-2): 189-195.
- Nguyen, M. T. and K. Charlebois (2015). "The clinical utility of whole-exome sequencing in the context of rare diseases - the changing tides of medical practice." *Clin Genet* 88(4): 313-319.
- Niida, Y., A. Yokoi, M. Kuroda, Y. Mitani, H. Nakagawa and M. Ozaki (2016). "A girl with infantile neuronal ceroid lipofuscinosis caused by novel PPT1 mutation and paternal uniparental isodisomy of chromosome 1." *Brain Dev.*
- Novarino, G., P. El-Fishawy, H. Kayserili, N. A. Meguid, E. M. Scott, J. Schroth, J. L. Silhavy, M. Kara, R. O. Khalil, T. Ben-Omran, A. G. Ercan-Sencicek, A. F. Hashish, S. J. Sanders, A. R. Gupta, H. S. Hashem, D. Matern, S. Gabriel, L. Sweetman, Y. Rahimi, R. A. Harris, M. W. State and J. G. Gleeson (2012). "Mutations in BCKD-kinase lead to a potentially treatable form of autism with epilepsy." *Science* 338(6105): 394-397.
- Nur, B. G., P. Gencpinar, A. Yuzbasioglu, S. D. Emre and E. Mihci (2015). "Chanarin-Dorfman syndrome: Genotype-Phenotype Correlation." *Eur J Med Genet* 58(4): 238-242.
- Owusu-Ansah, E., A. Yavari, S. Mandal and U. Banerjee (2008). "Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint." *Nat Genet* 40(3): 356-361.
- Oyarzabal, A., M. Martinez-Pardo, B. Merinero, R. Navarrete, L. R. Desviat, M. Ugarte and P. Rodriguez-Pombo (2013). "A novel regulatory defect in the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex due to a mutation in the PPM1K gene causes a mild variant phenotype of maple syrup urine disease." *Hum Mutat* 34(2): 355-362.
- Papenhausen, P., S. Schwartz, H. Risheg, E. Keitges, I. Gadi, R. D. Burnside, V. Jaswaney, J. Pappas, R. Pasion, K. Friedman and J. Tepperberg (2011). "UPD detection using homozygosity profiling with a SNP genotyping microarray." *Am J Med Genet A* 155A(4): 757-768.
- Pardridge, W. M. and T. B. Choi (1986). "Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier." *Fed Proc* 45(7): 2073-2078.
- Parker, P. J. and P. J. Randle (1978). "Inactivation of rat heart branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex by adenosine triphosphate." *FEBS Lett* 95(1): 153-156.

- Parker, P. J. and P. J. Randle (1978). "Partial purification and properties of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase of ox liver." *Biochem J* 171(3): 751-757.
- Paxton, R. and R. A. Harris (1984). "Clofibril acid, phenylpyruvate, and dichloroacetate inhibition of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase in vitro and in perfused rat heart." *Arch Biochem Biophys* 231(1): 58-66.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* 22(2): 153-183.
- Pedersen, C. B., Z. Zolkipli, S. Vang, J. Palmfeldt, M. Kjeldsen, V. Stenbroen, S. P. Schmidt, R. J. Wanders, J. P. Ruiter, F. Wibrand, I. Tein and N. Gregersen (2010). "Antioxidant dysfunction: potential risk for neurotoxicity in ethylmalonic aciduria." *J Inher Metab Dis* 33(3): 211-222.
- Popov, K. M., Y. Zhao, Y. Shimomura, J. Jaskiewicz, N. Y. Kedishvili, J. Irwin, G. W. Goodwin and R. A. Harris (1995). "Dietary control and tissue specific expression of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase." *Arch Biochem Biophys* 316(1): 148-154.
- Popov, K. M., Y. Zhao, Y. Shimomura, M. J. Kuntz and R. A. Harris (1992). "Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase. Molecular cloning, expression, and sequence similarity with histidine protein kinases." *J Biol Chem* 267(19): 13127-13130.
- Quental, S., A. Gusmao, P. Rodriguez-Pombo, M. Ugarte, L. Vilarinho, A. Amorim and M. J. Prata (2009). "Revisiting MSUD in Portuguese Gypsies: evidence for a founder mutation and for a mutational hotspot within the BCKDHA gene." *Ann Hum Genet* 73(Pt 3): 298-303.
- Quinlan, C. L., R. L. Goncalves, M. Hey-Mogensen, N. Yadava, V. I. Bunik and M. D. Brand (2014). "The 2-oxoacid dehydrogenase complexes in mitochondria can produce superoxide/hydrogen peroxide at much higher rates than complex I." *J Biol Chem* 289(12): 8312-8325.
- Ramanathan, A. and S. L. Schreiber (2009). "Direct control of mitochondrial function by mTOR." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(52): 22229-22232.
- Rani, V., G. Deep, R. K. Singh, K. Palle and U. C. Yadav (2016). "Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies." *Life Sci*.
- Reed, L. J. (2001). "A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes." *J Biol Chem* 276(42): 38329-38336.
- Reed, L. J. and M. L. Hackert (1990). "Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases." *J Biol Chem* 265(16): 8971-8974.
- Rodriguez-Pombo, P., R. Navarrete, B. Merinero, P. Gomez-Puertas and M. Ugarte (2006). "Mutational spectrum of maple syrup urine disease in Spain." *Hum Mutat* 27(7): 715.
- Rose, S., R. E. Frye, J. Slattery, R. Wynne, M. Tippet, O. Pavliv, S. Melnyk and S. J. James (2014). "Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction in a subset of autism lymphoblastoid cell lines in a well-matched case control cohort." *PLoS One* 9(1): e85436.
- Rossignol, D. A. and R. E. Frye (2014). "Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism." *Front Physiol* 5: 150.

- Sanchez-Alcudia, R., B. Perez, C. Perez-Cerda, M. Ugarte and L. R. Desviat (2011). "Overexpression of adapted U1snRNA in patients' cells to correct a 5' splice site mutation in propionic acidemia." *Mol Genet Metab* 102(2): 134-138.
- Schriever, S. C., M. J. Deutsch, J. Adamski, A. A. Roscher and R. Ensenauer (2013). "Cellular signaling of amino acids towards mTORC1 activation in impaired human leucine catabolism." *J Nutr Biochem* 24(5): 824-831.
- Schrijver, I., N. Aziz, D. H. Farkas, M. Furtado, A. F. Gonzalez, T. C. Greiner, W. W. Grody, T. Hambuch, L. Kalman, J. A. Kant, R. D. Klein, D. G. Leonard, I. M. Lubin, R. Mao, N. Nagan, V. M. Pratt, M. E. Sobel, K. V. Voelkerding and J. S. Gibson (2012). "Opportunities and challenges associated with clinical diagnostic genome sequencing: a report of the Association for Molecular Pathology." *J Mol Diagn* 14(6): 525-540.
- Sgaravatti, A. M., R. B. Rosa, P. F. Schuck, C. A. Ribeiro, C. M. Wannmacher, A. T. Wyse, C. S. Dutra-Filho and M. Wajner (2003). "Inhibition of brain energy metabolism by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease." *Biochim Biophys Acta* 1639(3): 232-238.
- She, P., K. C. Olson, Y. Kadota, A. Inukai, Y. Shimomura, C. L. Hoppel, S. H. Adams, Y. Kawamata, H. Matsumoto, R. Sakai, C. H. Lang and C. J. Lynch (2013). "Leucine and protein metabolism in obese Zucker rats." *PLoS One* 8(3): e59443.
- Shestopalov, A. I. and B. S. Kristal (2007). "Branched chain keto-acids exert biphasic effects on alpha-ketoglutarate-stimulated respiration in intact rat liver mitochondria." *Neurochem Res* 32(4-5): 947-951.
- Shimomura, Y., T. Honda, M. Shiraki, T. Murakami, J. Sato, H. Kobayashi, K. Mawatari, M. Obayashi and R. A. Harris (2006). "Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease." *J Nutr* 136(1 Suppl): 250S-253S.
- Shimomura, Y., N. Nanaumi, M. Suzuki, K. M. Popov and R. A. Harris (1990). "Purification and partial characterization of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase from rat liver and rat heart." *Arch Biochem Biophys* 283(2): 293-299.
- Siegel, D. H. and A. Slavotinek (2005). "Uniparental disomy." *Pediatr Dermatol* 22(5): 482-487.
- Simon, E., N. Flaschker, P. Schadewaldt, U. Langenbeck and U. Wendel (2006). "Variant maple syrup urine disease (MSUD)--the entire spectrum." *J Inher Metab Dis* 29(6): 716-724.
- Sitta, A., G. S. Ribas, C. P. Mescka, A. G. Barschak, M. Wajner and C. R. Vargas (2014). "Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress." *Cell Mol Neurobiol* 34(2): 157-165.
- Skvorak, K. J. (2009). "Animal models of maple syrup urine disease." *J Inher Metab Dis* 32(2): 229-246.
- Smith, Q. R., S. Momma, M. Aoyagi and S. I. Rapoport (1987). "Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier." *J Neurochem* 49(5): 1651-1658.
- Starkov, A. A., G. Fiskum, C. Chinopoulos, B. J. Lorenzo, S. E. Browne, M. S. Patel and M. F. Beal (2004). "Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species." *J Neurosci* 24(36): 7779-7788.
- Strauss, K. A., E. G. Puffenberger and D. H. Morton (1993). *Maple Syrup Urine Disease. GeneReviews(R)*. R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger et al. Seattle (WA).
- Strauss, K. A., B. Wardley, D. Robinson, C. Hendrickson, N. L. Rider, E. G. Puffenberger, D. Shellmer, A. B. Moser and D. H. Morton (2010). "Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design." *Mol Genet Metab* 99(4): 333-345.

- Streck, E. L., C. L. Goncalves, C. B. Furlanetto, G. Scaini, F. Dal-Pizzol and J. Quevedo (2014). "Mitochondria and the central nervous system: searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders." *Rev Bras Psiquiatr* 36(2): 156-167.
- Sun, H., G. Lu, S. Ren, J. Chen and Y. Wang (2011). "Catabolism of branched-chain amino acids in heart failure: insights from genetic models." *Pediatr Cardiol* 32(3): 305-310.
- Sunny, N. E., S. Kalavalapalli, F. Bril, T. J. Garrett, M. Nautiyal, J. T. Mathew, C. M. Williams and K. Cusi (2015). "Cross-talk between branched-chain amino acids and hepatic mitochondria is compromised in nonalcoholic fatty liver disease." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309(4): E311-319.
- Suryawan, A., J. W. Hawes, R. A. Harris, Y. Shimomura, A. E. Jenkins and S. M. Hutson (1998). "A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism." *Am J Clin Nutr* 68(1): 72-81.
- Tamura, M., T. Isojima, M. Kawashima, H. Yoshida, K. Yamamoto, T. Kitaoka, N. Namba, A. Oka, K. Ozono, K. Tokunaga and S. Kitanaka (2015). "Detection of Hereditary 1,25-Hydroxyvitamin D-Resistant Rickets Caused by Uniparental Disomy of Chromosome 12 Using Genome-Wide Single Nucleotide Polymorphism Array." *PLoS One* 10(7): e0131157.
- Teare, M. D. and M. F. Santibanez Koref (2014). "Linkage analysis and the study of Mendelian disease in the era of whole exome and genome sequencing." *Brief Funct Genomics* 13(5): 378-383.
- Tretter, L. and V. Adam-Vizi (2004). "Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase." *J Neurosci* 24(36): 7771-7778.
- Tretter, L. and V. Adam-Vizi (2005). "Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1464): 2335-2345.
- Tso, S. C., X. Qi, W. J. Gui, J. L. Chuang, L. K. Morlock, A. L. Wallace, K. Ahmed, S. Laxman, P. M. Campeau, B. H. Lee, S. M. Hutson, B. P. Tu, N. S. Williams, U. K. Tambar, R. M. Wynn and D. T. Chuang (2013). "Structure-based design and mechanisms of allosteric inhibitors for mitochondrial branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(24): 9728-9733.
- Vafai, S. B. and V. K. Mootha (2012). "Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle." *Nature* 491(7424): 374-383.
- Varanyuwatana, P. and A. P. Halestrap (2012). "The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore." *Mitochondrion* 12(1): 120-125.
- Vaubel, R. A., P. Rustin and G. Isaya (2011). "Mutations in the dimer interface of dihydrolipoamide dehydrogenase promote site-specific oxidative damages in yeast and human cells." *J Biol Chem* 286(46): 40232-40245.
- Vega, A. I., C. Medrano, R. Navarrete, L. R. Desviat, B. Merinero, P. Rodriguez-Pombo, I. Vitoria, M. Ugarte, C. Perez-Cerda and B. Perez (2016). "Molecular diagnosis of glycogen storage disease and disorders with overlapping clinical symptoms by massive parallel sequencing." *Genet Med*.
- Venditti, P., L. Di Stefano and S. Di Meo (2013). "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species." *Mitochondrion* 13(2): 71-82.
- Wai, T., J. Garcia-Prieto, M. J. Baker, C. Merkwirth, P. Benit, P. Rustin, F. J. Ruperez, C. Barbas, B. Ibanez and T. Langer (2015). "Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice." *Science* 350(6265): aad0116.
- Wai, T. and T. Langer (2016). "Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation." *Trends Endocrinol Metab* 27(2): 105-117.

- Wajner, A., C. Burger, C. S. Dutra-Filho, M. Wajner, A. T. de Souza Wyse and C. M. Wannmacher (2007). "Synaptic plasma membrane Na(+), K (+)-ATPase activity is significantly reduced by the alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease in rat cerebral cortex." *Metab Brain Dis* 22(1): 77-88.
- Wallace, D. C. and W. Fan (2009). "The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse." *Genes Dev* 23(15): 1714-1736.
- Wang, R. and D. R. Green (2012). "Metabolic checkpoints in activated T cells." *Nat Immunol* 13(10): 907-915.
- Wang, X. L., C. J. Li, Y. Xing, Y. H. Yang and J. P. Jia (2015). "Hypervalinemia and hyperleucine-isoleucinemia caused by mutations in the branched-chain-amino-acid aminotransferase gene." *J Inherit Metab Dis* 38(5): 855-861.
- Weidinger, A. and A. V. Kozlov (2015). "Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction." *Biomolecules* 5(2): 472-484.
- Wynn, R. M., J. L. Chuang, C. D. Cote and D. T. Chuang (2000). "Tetrameric assembly and conservation in the ATP-binding domain of rat branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase." *J Biol Chem* 275(39): 30512-30519.
- Wynn, R. M., M. Kato, M. Machius, J. L. Chuang, J. Li, D. R. Tomchick and D. T. Chuang (2004). "Molecular mechanism for regulation of the human mitochondrial branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex by phosphorylation." *Structure* 12(12): 2185-2196.
- Wynn, R. M., J. Li, C. A. Brautigam, J. L. Chuang and D. T. Chuang (2012). "Structural and biochemical characterization of human mitochondrial branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase phosphatase." *J Biol Chem* 287(12): 9178-9192.
- Yamazawa, K., T. Ogata and A. C. Ferguson-Smith (2010). "Uniparental disomy and human disease: an overview." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C(3): 329-334.
- Yang, N., L. Han, X. Gu, J. Ye, W. Qiu, H. Zhang, Z. Gong and Y. Zhang (2012). "Analysis of gene mutations in Chinese patients with maple syrup urine disease." *Mol Genet Metab* 106(4): 412-418.
- Yang, Y., S. Karakhanova, W. Hartwig, J. G. D'Haese, P. P. Philippov, J. Werner and A. V. Bazhin (2016). "Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anti-cancer Therapy." *J Cell Physiol*.
- Yudkoff, M., I. Nissim, S. Kim, D. Pleasure, K. Hummeler and S. Segal (1983). "[15N] leucine as a source of [15N] glutamate in organotypic cerebellar explants." *Biochem Biophys Res Commun* 115(1): 174-179.
- Zastre, J. A., R. L. Sweet, B. S. Hanberry and S. Ye (2013). "Linking vitamin B1 with cancer cell metabolism." *Cancer Metab* 1(1): 16.
- Zhao, Y., K. M. Popov, Y. Shimomura, N. Y. Kedishvili, J. Jaskiewicz, M. J. Kuntz, J. Kain, B. Zhang and R. A. Harris (1994). "Effect of dietary protein on the liver content and subunit composition of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex." *Arch Biochem Biophys* 308(2): 446-453.
- Zhou, M., G. Lu, C. Gao, Y. Wang and H. Sun (2012). "Tissue-specific and nutrient regulation of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase phosphatase, protein phosphatase 2Cm (PP2Cm)." *J Biol Chem* 287(28): 23397-23406.
- Zinnanti, W. J., J. Lazovic, K. Griffin, K. J. Skvorak, H. S. Paul, G. E. Homanics, M. C. Bewley, K. C. Cheng, K. F. Lanoue and J. M. Flanagan (2009). "Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease." *Brain* 132(Pt 4): 903-918.

- Zorov, D. B., M. Juhaszova and S. J. Sollott (2006). "Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review." *Biochim Biophys Acta* 1757(5-6): 509-517.
- Zorov, D. B., M. Juhaszova, Y. Yaniv, H. B. Nuss, S. Wang and S. J. Sollott (2009). "Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore." *Cardiovasc Res* 83(2): 213-225.
- Zorzano, A., M. I. Hernandez-Alvarez, D. Sebastian and J. P. Munoz (2015). "Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling." *Antioxid Redox Signal* 22(12): 1020-1031.

8 PUBLICACIONES



PUBLICACIONES DIRECTAMENTE RELACIONADAS CON EL CONTENIDO DE LA TESIS

Oyarzabal, A., M. Martinez-Pardo, B. Merinero, R. Navarrete, L. R. Desviat, M. Ugarte and P. Rodriguez-Pombo (2013). "A novel regulatory defect in the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex due to a mutation in the PPM1K gene causes a mild variant phenotype of maple syrup urine disease." Hum Mutat 34(2): 355-362.

137

Garcia-Cazorla, A. *, A. Oyarzabal*, J. Fort*, C. Robles, E. Castejon, P. Ruiz-Sala, S. Bodoy, B. Merinero, A. Lopez-Sala, J. Dopazo, V. Nunes, M. Ugarte, R. Artuch, M. Palacin, P. Rodriguez-Pombo, P. Alcaide, R. Navarrete, P. Sanz, M. Font-Llitjos, M. A. Vilaseca, A. Ormaizabal, A. Pristoupilova and S. B. Agullo (2014). "Two novel mutations in the BCKDK (branched-chain keto-acid dehydrogenase kinase) gene are responsible for a neurobehavioral deficit in two pediatric unrelated patients." Hum Mutat 35(4): 470-477.

Oyarzabal, A., I. Bravo-Alonso, M. Sanchez-Arago, M. T. Rejas, B. Merinero, A. Garcia-Cazorla, R. Artuch, M. Ugarte and P. Rodriguez-Pombo (2016). "Mitochondrial response to the BCKDK-deficiency: Some clues to understand the positive dietary response in this form of autism." Biochim Biophys Acta 1862(4): 592-600.

Bravo-Alonso, I., A. Oyarzabal, M. Sanchez-Arago, M. T. Rejas, B. Merinero, A. Garcia-Cazorla, R. Artuch, M. Ugarte and P. Rodriguez-Pombo (2016). "Dataset reporting BCKDK interference in a BCAA-catabolism restricted environment." Data Brief 7: 755-759.

PUBLICACIONES NO DIRECTAMENTE RELACIONADAS CON EL CONTENIDO DE LA TESIS

Ortigoza-Escobar, J. D., M. Serrano, M. Molero, A. Oyarzabal, M. Rebollo, J. Muchart, R. Artuch, P. Rodriguez-Pombo and B. Perez-Duenas (2014). "Thiamine transporter-2 deficiency: outcome and treatment monitoring." Orphanet J Rare Dis 9: 92.

Ortigoza-Escobar, J. D., M. Molero-Luis, A. Arias, A. Oyarzabal, N. Darin, M. Serrano, A. Garcia-Cazorla, M. Tondo, M. Hernandez, J. Garcia-Villoria, M. Casado, L. Gort, J. A. Mayr, P. Rodriguez-Pombo, A. Ribes, R. Artuch and B. Perez-Duenas (2016). "Free-thiamine is a potential biomarker of thiamine transporter-2 deficiency: a treatable cause of Leigh syndrome." Brain 139(Pt 1): 31-38.

Ortigoza-Escobar, J. D., A. Oyarzabal, R. Montero, R. Artuch, C. Jou, C. Jimenez, L. Gort, P. Briones, J. Muchart, E. Lopez-Gallardo, S. Emperador, E. R. Pesini, J. Montoya, B. Perez, P. Rodriguez-Pombo and B. Perez-Duenas (2016). "Ndufs4 related Leigh syndrome: A case report and review of the literature." Mitochondrion.

